

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Regeneração e transformação em ***Eucalyptus grandis***

Susana Rodrigues Ribeiro

Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Regeneração e transformação em ***Eucalyptus grandis***

Susana Rodrigues Ribeiro

Dissertação Orientada Por:
Professor Doutor Pedro Fevereiro
Doutora Susana Araújo

Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2012

Agradecimentos

O trabalho de investigação apresentado nesta dissertação de Mestrado foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Células Vegetais do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, sob a co-orientação do Professor Doutor Pedro Fevereiro e da Doutora Susana Araújo.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, por aceitarem a orientação deste trabalho científico, pela ajuda, apoio e interesse constante ao longo deste último ano.

Ao Professor Doutor Pedro Fevereiro, agradeço o entusiasmo e a motivação ao longo do trabalho experimental. O seu rigor científico e a dedicação ao trabalho foram para mim uma inspiração constante.

À Doutora Susana Araújo, agradeço o acompanhamento e conhecimentos, disponibilidade e paciência na correcção desta dissertação, em território romeno. Sem os seus conselhos, dicas, espírito crítico e optimismo este trabalho não teria sido possível.

Ao Doutor Jorge Paiva pela disponibilização do material vegetal e pela boa disposição.

À Doutora Ana Sofia Duque pelas dicas e apoio no trabalho laboratorial, pela disponibilização de material de trabalho e pela inesgotável simpatia.

À Rita Morgado pela paciência e apoio e ajuda na preparação das reacções de PCR.

A todos os restantes colegas de laboratório pela simpatia e motivação para o sucesso do meu trabalho.

À Renata Santos agradeço o companheirismo, as dicas e discussões que me ajudaram a concluir este trabalho, as gargalhadas e os inesquecíveis momentos passados na Faculdade de Ciências.

Ao Américo Vieira Jr. (my Boo) pelo amor incondicional, pela amizade e apoio que me reconstruíram.

Finalmente, quero agradecer a toda a minha família, especialmente à minha mãe, por todo o apoio e por acreditarem em mim e na minha formação.

Resumo

Eucalyptus grandis é uma das espécies, dentro do género *Eucalyptus*, com maior interesse económico a nível mundial. A transformação genética em *Eucalyptus* pode contribuir para a introdução de caracteres de interesse económico, que permitam melhorar a produtividade e qualidade da madeira e outros produtos, ou conferir resistência a pragas, doenças ou condições ambientais. Os sistemas de transformação requerem um sistema de regeneração de plantas *in vitro* eficiente, via embriogénese somática ou organogénese. Neste trabalho, para obtenção de embriogénese somática, foram estudadas mais de 30 condições diferentes a partir de explantes foliares, caulinares (entrenós) e radiculares. Embora não se tenham obtidos embriões somáticos, alguns tratamentos apresentaram organogénese de raízes (os melhores resultados obtiveram-se em 2 e 3 mg/L de NAA). A regeneração por organogénese foi testada em 10 condições diferentes, com sucesso em 80% dos tratamentos (obtenção de gemas adventícias e plântulas). Os melhores resultados foram obtidos nas combinações BA (2mg/L) e NAA (1mg/L), em meio WPM, e BA (2mg/L) e NAA (0,5mg/L), em meio MS. O isolamento das plântulas regeneradas em condições de crescimento apical e, posteriormente, em condições de enraizamento, resultou na obtenção de plantas completas de *Eucalyptus grandis*. Procedeu-se também à transformação de explantes foliares com a estirpe EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* que, resultou na regeneração de raízes, quando submetidos a meio de selecção (10mg/L de canamicina) suplementado com 2mg/L de NAA (indução da organogénese de raízes). A eficiência de transformação, pelo protocolo apresentado neste trabalho, é de 2,3%. Quando submetidas a microscopia de epifluorescência ($\lambda_{ex}=480/40nm$) as raízes regeneradas a partir de explantes infectados emitiram fluorescência, confirmando a expressão de GFP nas raízes regeneradas transgénicas.

Palavras-chave: Embriogénese somática, organogénese, transformação genética, *Agrobacterium tumefaciens*, expressão de GFP, *Eucalyptus grandis*.

Abstract

Eucalyptus grandis is one of the species, within the *Eucalyptus* genus, with most significant economical importance worldwide. Genetic transformation in *Eucalyptus* may contribute to increase productivity by the introduction of desirable traits, such as pest resistance and improvement of wood quality. However, the prerequisite for the success of the transformation strategy is the establishment of an efficient in vitro regeneration system, either through somatic embryogenesis or organogenesis. In this work over 30 different conditions were studied, in order to achieve somatic embryogenesis, while using leaves, roots and internodal segments as explants. Although the production of somatic embryos wasn't successful, some treatments showed root organogenesis (best results achieved with 2 and 3mg/L of NAA). Plant regeneration through organogenesis was tested in 10 different conditions, with 80% of these being successful (induction of adventitious shoots and plantlets conversion). The best organogenesis results were reported with the combination of BA (2mg/L) plus NAA (1mg/L), in WPM medium, and BA (2mg/L) plus NAA (0,5mg/L), in MS medium. The isolation of regenerated plantlets on shoot growth and rooting medium allowed the regeneration of *Eucalyptus grandis* whole plants. Transformation of leaf explants was achieved using the EHA105 strain of *Agrobacterium tumefaciens*, resulting in root regeneration, when submitted to a selection medium (10mg/L of kanamycin) supplemented with 2mg/L of NAA (root organogenesis induction medium). With the protocol described in this work, the transformation efficiency was 2,3%. When submitted to epifluorescence microscopy ($\lambda_{ex}=480/40nm$), the regenerated roots, derived from infected explants, emitted green fluorescence, thus confirming GFP expression in the regenerated transgenic roots.

Key words: Somatic embryogenesis, organogenesis, genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, GFP expression, *Eucalyptus grandis*.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
Abreviaturas	vi
1. Introdução.....	1
1.1. O género <i>Eucalyptus</i>	2
1.2. Micropropagação	4
1.3. Engenharia genética em plantas	5
1.4. Regeneração <i>in vitro</i>	6
1.4.1. Embriogénese somática	6
1.4.2. Organogénese	8
1.5. Transformação genética em plantas	10
1.6. Objectivos	13
2. Materiais e métodos	14
2.1. Material vegetal e condições de crescimento	14
2.1.1. Micropropagação	14
2.1.2. Embriogénese somática	14
2.1.3. Organogénese	15
2.2. Optimização da concentração de canamicina usada em transformação	15
2.3. Transformação de <i>Eucalyptus grandis</i>	16
2.4. Confirmação da presença da construção p35sGusInt GFP em <i>A. tumefaciens</i>	16
2.5. Análise PCR	16
2.6. Preparação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para transformação	17
2.7. Co-cultura de explantes foliares e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.8. Selecção de tecidos transgénicos e indução de raízes	18
2.9. Detecção da expressão da construção inserida	18
2.9.1. Análise histoquímica da actividade da β - glucuronidase	18
2.9.2. Detecção da expressão de GFP	19
2.10. Análise de resultados e registo fotográfico	19
3. Resultados.....	20
3.1. Embriogénese somática	20
3.1.1. Indução de calos	20
3.1.2. Organogénese de raízes	22
3.2. Organogénese	26
3.2.1. Indução de calos	26
3.2.2. Indução e desenvolvimento de gemas adventícias	27
3.3. Optimização da concentração de canamicina usada em transformação	29

3.4. Transformação	30
3.4.1. Regeneração e selecção dos tecidos transgénicos	30
3.4.2. Análise histoquímica da actividade da β -glucuronidase	31
3.4.3. Detecção da expressão de GFP	31
4. Discussão	32
4.1. Regeneração	32
4.1.1. Embriogénese somática	32
4.1.2. Organogénese	35
4.2. Transformação	36
4.3. Perspectivas futuras	37
5. Referências	40

Abreviaturas

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABA - Ácido abscísico

BAP - 6-benzilaminopurina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleósidos trifosfatados

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EHA105 - Estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada

ES - Embriogénese somática

GFP - Proteína verde fluorescente (“Green fluorescent protein”)

gfp - Gene que codifica a proteína fluorescente verde (GFP)

gus - Gene que codifica a enzima β -glucuronidase

GUS - Enzima β -glucuronidase

IBA - Ácido indol-3-butírico

Kb - Quilobase ou 1000 pares de bases

LB - Meio Luria Broth

Mbp - Mega pares de bases (“Mega base pairs”) ou um milhão de pares de bases

MS - Meio de cultura Murashige and Skoog

MS/2 - Meio de cultura Murashige and Skoog com 50% de força

NAA - Ácido naftaleno-acético

nptII - Gene que codifica a fosfotransferase de neomicina

PCR - Reacção de polimerização em cadeia (“Polymerase Chain Reaction”)

PEG - Polietilenoglicol

PVP - Polivinilpirrolidona

RNA - Ácido ribonucleico

TBE - Tampão tris-boro EDTA

T-DNA - Região transferida de DNA do plasmídeo Ti

TDZ - Thidiazuron

Ti - Plasmídeo indutor de tumors (“Tumor inducing”)

WPM - Woody Plant Medium

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

Zea – Zeatina

1. Introdução

Em Portugal, as florestas ocupam cerca de um terço do território nacional, o que corresponde a 3,4 milhões de hectares. Os produtos florestais fornecem matéria-prima para várias indústrias, representando 10% das exportações nacionais e gerando 113 mil empregos directos (PEFC Portugal, 2010). Os produtos florestais, como madeira e papel, representam 3% do produto interno bruto mundial, sendo assim fonte de sustento e receita para muitas comunidades a nível mundial.

As indústrias que utilizam produtos florestais encontram-se em desenvolvimento constante, tornando-se cada vez mais exigentes e competitivas. Neste contexto, são necessárias estratégias que aumentem ou melhorem a produtividade florestal (Golle *et al.*, 2009). Dentro das soluções possíveis, o melhoramento convencional apresenta várias desvantagens como a baixa variabilidade existente em espécies florestais, dificuldade no controlo de processos de polinização e fecundação, a necessidade de grandes áreas de plantação, incompatibilidade sexual e o ciclo de vida longo, o que torna este procedimento difícil e demorado. Outras abordagens baseadas em ferramentas da biotecnologia, nomeadamente a transformação e produção de plantas transgénicas, constituem uma alternativa válida a ser explorada. Recorrendo a esta metodologia muitas das dificuldades, descritas anteriormente podem ser ultrapassadas, viabilizando assim ganhos consideráveis na qualidade dos produtos finais. Isto é possível devido à maior rapidez, previsibilidade, precisão e grande conhecimento dos genes introduzidos, característicos desta técnica (Gepts, 2002; Studart-Guimarães *et al.*, 2003; Sartoretto *et al.*, 2008).

Em termos de melhoramento de espécies florestais, os principais objectivos são: o aumento da biomassa, aumento da produtividade (madeira, fibras, energia renovável); alterações das propriedades químicas da madeira (teor de lenhina e celulose); modificações das propriedades físicas da madeira (ângulo das fibras, espessura da parede); resistência a doenças; tolerância a stresses abióticos (seca, salinidade, etc); melhoria na capacidade fotossintética e dos caracteres fisiológicos; uso em biorremediação; a produção de compostos farmacêuticos e; alterações na arquitectura da árvore (ramos, nós, intercepção da luz), entre outros (Grattapaglia, 2008).

Um dos mais importantes géneros, e onde a transformação genética é mais desejável, é o género *Eucalyptus* (apenas algumas espécies). Os principais produtos, com grande interesse económico, são a madeira, pasta de papel, madeira para produção de carvão ou como fonte de energia e folhagem, usada na indústria farmacêutica e cosmética devido à abundância em óleos essenciais (Albuquerque, 2009).

1.1. O género *Eucalyptus*

O nome do género deriva do grego (eu – bem; kalypto – cobrir) devido ao característico opérculo que cobre as flores imaturas. O género *Eucalyptus* compreende mais de 700 espécies, embora apenas 50 destas sejam economicamente relevantes (Albuquerque, 2009) e tem como centro de origem a Austrália e regiões próximas de Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas, numa faixa compreendida entre as latitudes 9N e 44S (Eldridge *et al.* 1993). Este género pertence à família Myrtaceae e está dividido em 8 subgéneros, com o subgénero *Symphyomyrthus* a representar a maioria das espécies do género. Dois destes subgéneros (Corymbia e Blakella) foram formalmente separados do género *Eucalyptus* e estudos de análise a caracteres morfológicos e moleculares identificaram duas grandes linhagens: uma compreendendo o género *Angophora* e *Corymbia* e outra com todos os subgnéneros de *Eucalyptus* (Figura 1, Rozefelds, 1996; Alves, 2005).

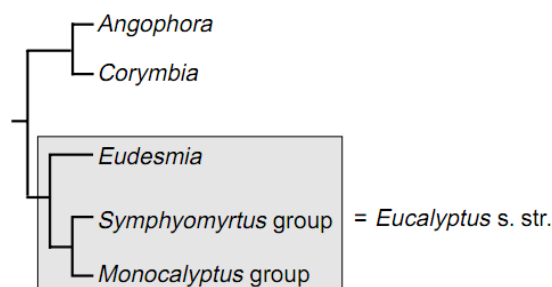


Figura 1 – Diagrama simplificado demonstrando as relações entre *Eucalyptus*, *Angophora* e *Corymbia* (adaptado de Rozefelds 1996)

As árvores do género *Eucalyptus* são conhecidas pelo seu crescimento rápido, capacidade de desenvolvimento numa variedade vasta de climas e solos e pela qualidade da madeira, tanto para produtos sólidos como para a produção de pasta de papel. As flores são monoicas com polinização cruzada na maioria dos casos, dependente de vectores como insectos. Os frutos maduros são cápsulas lenhosas que contêm várias sementes. A maturidade de reprodução está associada à transição da folhagem jovem para adulta, mas a idade em que ocorre varia entre as diferentes espécies (Pinto, 2007).

As espécies de *Eucalyptus* estão entre as mais plantadas em todo o mundo, tendo sido sugerido por Eldridge *et al.* (1993) que as mais importantes são *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. globulus* entre outras.

Eucalyptus grandis é uma espécie nativa da costa leste da Austrália, embora se tenha disseminado por 4 continentes, com mais de meio milhão de hectares plantados em regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que a área mundial coberta por plantas do género *Eucalyptus* totaliza 20 milhões de hectares (GIT Forestry, 2008), tornando-se assim uma das mais importantes espécies comerciais de eucalipto. Existem programas de plantação em massa na República da África do Sul e Brasil (Meskimen e Francis). No Brasil esta espécie é maioritária, em conjunto com *E. urophylla* e *E. saligna* e respectivos híbridos interespecíficos (Alves, 2005).

A floresta de eucaliptos corresponde a 20,6% do total de florestas, o que corresponde a mais 647 mil hectares em Portugal (PEFC, 2010). *Eucalyptus globulus* é a espécie mais frequente, enquanto no Brasil os eucaliptais ocupam mais de dois terços de uma área plantada de 4,8 milhões de hectares (Studart-Guimarães *et al.*, 2003), sendo as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* as mais comuns, entre outras (Queiroz *et al.* 2010). Em Portugal foram introduzidas cerca de 250 espécies de eucalipto desde o século XIX (Albuquerque, 2009), sendo uma delas *Eucalyptus grandis*. No entanto, de acordo com os dados obtidos pela Autoridade Florestal Nacional e pelo Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas, publicados em Diário da República (Art.º 1º e ANEXO II do Decreto-Lei nº 565/99), esta espécie não indígena tem apenas interesse para arborização, com ocorrência rara.

As árvores de *Eucalyptus grandis* são de grande porte (altura varia entre 45 a 55 metros) e, quando crescem em condições favoráveis, apresentam uma das produtividades mais significativas dentro das plantações de eucaliptos (Eldridge *et al.*, 1993). A espécie *E. grandis* é descrita como sensível a geadas severas mas apresenta uma resistência relativa ao deficit hídrico. A madeira proveniente destas árvores é considerada leve e fácil de trabalhar. No entanto, por ser uma árvore de crescimento rápido, esta madeira pode apresentar vários defeitos quando submetida a secagem e processamento, como distorções (dificulta os planos de corte de uma peça de madeira) e rupturas (ocorrem devido à existência de tensões que se sobrepõem à resistência dos tecidos lenhosos) (Galvão e Jankowsky, 1985). Uma descrição das diferentes aplicações e produtos resultantes da exploração desta espécie são descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 (esquerda) e Tabela 2 (direita) – Produtos e serviços disponíveis para a espécie *Eucalyptus grandis*. Legenda: ✓ = potencialmente adequado; ✓✓ = muito adequado.

Fonte: http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0005/356081/Eucalyptus-grandis.pdf

Produto comercial	Adequação
Madeira sólida (construção, mobiliário, energia, encaixotamento, postes, estacas, cercas, etc.)	✓✓
Madeira em painéis	✓✓
Madeira processada (polpa, papel, serradura, carvão activo e carvão)	✓✓
Madeira em placa fina (veneer)	✓
Químicos (taninos, óleos, borrachas e látex)	-
Flores/folhagem	-
Alimentação de gado	-
Alimentação	-
Produção de mel (mel, pólen e néctar)	✓
Produtos medicinais	-
Sementes	-

Serviços ambientais	Adequação
Habitat	✓✓
Fixação de azoto	-
Controlo de salinidade	-
Sombra e abrigo	✓
Conservação de solos/água	✓
Protecção contra vento	-

As árvores de *Eucalyptus grandis* são diplóides ($2n = 22$), e com um genoma de tamanho aproximado de 691 Mbp. O genoma de *Eucalyptus grandis* (clone BRASUZ1) já foi sequenciado (Myburg *et al.*, 2011) estando a maioria dos dados disponíveis para consulta online (www.eucagen.org). Prevê-se a publicação da sequência completa do genoma ainda no corrente ano de 2012. A disponibilização da sequência do genoma desta espécie (genoma de referência) constitui uma ferramenta essencial no âmbito de estudos de genómica comparativa a ser aplicada em programas de melhoramento dentro do género *Eucalyptus* (Myburg *et al.*, 2011).

1.2. Micropropagação

A elevada importância económica das características da madeira de *Eucalyptus* leva à necessidade da propagação clonal dos genótipos de interesse, ou seja, a multiplicação vegetativa de plantas de modo a garantir a constância das características que se pretendem para *Eucalyptus*. Existem várias técnicas de propagação, como a estaquia, enxertia, miniestaquia e microestaquia, mas a técnica que se destaca, pelas suas inúmeras vantagens, é a micropropagação (Watt *et al.*, 1995; Xavier *et al.*, 1997). A micropropagação tem o potencial para obter taxas de multiplicação muito elevadas em curtos intervalos de tempo, sendo assim fundamental para programas de melhoramento, principalmente em espécies recalcitrantes como o *Eucalyptus*. Esta técnica depende muito de factores como o tipo, origem e condição fisiológica do explante, meios de cultura e, em especial, do tempo de exposição do explante aos reguladores de crescimento, além da idade e diferenciação do tecido do explante e capacidade de resposta destes (Tang *et al.*, 2004).

A propagação clonal de *Eucalyptus* iniciou-se nos anos 60, tendo-se, entretanto, obtido vários protocolos e optimização de protocolos de regeneração de plantas completos. Segundo Le Roux e Van Staden (1991) entre 1968 e 1991 apenas 30 das 204 publicações submetidas incluíam protocolos de regeneração de plantas. Desde então até 2003, 29 de 65 novas publicações reportaram regeneração de plantas, demonstrando assim um crescente interesse em novos e melhorados protocolos de regeneração (Watt *et al.*, 2003).

De acordo com Le Roux e Van Staden (1991) foram estabelecidas culturas assépticas *in vitro* de *Eucalyptus* a partir de diferentes tipos de explante (sementes, plântulas, meristemas, flores, etc.), com origem juvenil ou adulta. O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais utilizado, sendo também comum aplicar um rácio de auxinas/citocinas muito baixo para crescimento apical (Watt *et al.*, 2003). No entanto continuam a existir vários problemas nas culturas *in vitro* de *Eucalyptus*, como a hiperhidricidade, senescência e oxidação devido à presença de fenóis (Pinto, 2007). Neste contexto, muitos dos trabalhos desenvolvidos ultimamente e trabalhos futuros baseiam-se na optimização da eficiência de protocolos de cultura *in vitro* ou na criação de novos

protocolos para as diferentes espécies de *Eucalyptus*. A existência de uma metodologia eficiente de cultura *in vitro* é crucial para o desenvolvimento de protocolos de regeneração e aplicação de estratégias de engenharia genética (Tournier *et al.*, 2003; Poke *et al.*, 2005).

1.3. Engenharia genética em plantas

A Biotecnologia é a integração das ciências naturais e engenharia para promover a aplicação de organismos, células, tecidos ou análogos moleculares para obtenção de produtos e serviços (Federação Europeia de Biotecnologia, 1989).

Durante muitos séculos foram feitos melhoramentos em várias plantas, principalmente em espécies agrícolas, através de cruzamentos selectivos e hibridação, ou seja, pela polinização controlada entre plantas. A biotecnologia vegetal permite uma extensão deste melhoramento tradicional, permitindo a transferência de maior variedade de informação genética de forma mais precisa e controlada (Monsanto, 2012; www.monsanto.co.uk). Esta tecnologia encontra-se em constante desenvolvimento e já se registaram inúmeros avanços tecnológicos (Flavel, 2004), em especial desde que foram apresentadas as primeiras plantas transgénicas, de tabaco, em 1983. Este evento é considerado por muitos como o início simbólico da era da engenharia genética em plantas, revelando uma grande potencialidade e promissoras possibilidades (Stewart, 2008). A engenharia genética permite a transferência de apenas um ou alguns genes de interesse. Estes genes de interesse podem ter origem na própria espécie ou em espécies não relacionadas, o que aumenta a disponibilidade de genes para melhoramento (Chan, 2010). A maior vantagem do uso desta ferramenta é permitir o desenvolvimento de variedades com as características benéficas pretendidas, sem que se manifestem outras não desejáveis (Monsanto, 2012; www.monsanto.co.uk).

O melhoramento genético, por engenharia genética, em espécies florestais teve o seu maior desenvolvimento a partir da década de 1950, a nível mundial, o que tem contribuído significativamente para a produção silvícola (Golle *et al.*, 2009). As técnicas de melhoramento tradicional aliadas às técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, utilização de marcadores moleculares, transformação genética, entre outras, permitiram a obtenção de genótipos com maior produtividade e qualidade em espécies florestais (Sartoretto *et al.*, 2008).

1.4. Regeneração *in vitro*

A cultura *in vitro* de tecidos baseia-se no facto de que as células vegetais têm a capacidade de regenerar uma nova planta, ou seja, são totipotentes. Diferentes explantes como protoplastos, células individuais, folhas, caules, flores raízes, entre outros, podem ser utilizados de modo a gerar uma nova planta em meio de cultura com os nutrientes e os reguladores de crescimento mais adequados. As suplementações adicionadas dependem das diferentes respostas que se pretendem dos explantes, nomeadamente crescimento apical, formação de calo, formação de embriões somáticos, desenvolvimento de raízes adventícias entre outras. Existem duas vias para a regeneração de plantas através de uma ou mais células totipotentes: a organogénese e a embriogénese somática. Estas duas vias de regeneração diferem em vários aspectos, sendo ambas respostas a diferentes rácios de reguladores de crescimento.

1.4.1. Embriogénese somática

A embriogénese somática é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se diferenciam e desenvolvem dando origem a um embrião sem ocorrência da fusão de gametas (Rodriguez *et al.*, 1995). O embrião somático passa pelos mesmos estádios de estádios característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos associados ao desenvolvimento de uma nova planta. A embriogénese somática e a zigótica apresentam grandes semelhanças na morfologia do embrião, no padrão de expressão de genes e proteínas permitindo que a embriogénese somática possa ser utilizada como modelo para estudo das diferentes etapas do desenvolvimento da embriogénese (Linacero *et al.*, 2001). Muitos dos genes, e respectivas proteínas, expressos durante este processo de embriogénese somática são descritos como genes de resposta a stress, o que leva muitos autores a considerar que a embriogénese somática é uma resposta extrema ao stress (Dudits *et al.*, 1995). A embriogénese somática pode ainda ser utilizada como modelo para estudos básicos de fisiologia e bioquímica do desenvolvimento vegetal, e numa vertente mais aplicada, para propagação clonal visando a conservação e o melhoramento genético das espécies (Steiner *et al.*, 2008).

As várias vantagens da ES são: a) obtenção de grande quantidade de embriões somáticos, b) possibilidade do uso de biorreactores, o que leva à redução dos custos por unidade produzida, c) a possibilidade do desenvolvimento sincronizado dos embriões, d) necessidade de pequenos espaços para este tipo de propagação, e) bipolaridade dos embriões, f) possibilidade de ser utilizada como modelo para vários tipos de estudos e a g) possibilidade de uso como ferramenta integrada em programas de melhoramento genético (Konan *et al.*, 2005). No entanto pode apresentar desvantagens como a variação

somaclonal, ocorrida após sucessivos subcultivos, e a dificuldade de obtenção de plantas em cultivo, devido às dificuldades de aclimação (Lakshmanan *et al.*, 2005).

De acordo com Steiner e colaboradores (2008) ocorrem duas fases diferentes durante o processo de embriogénese somática: indução e multiplicação, e maturação. Na fase de indução podem ocorrer dois padrões básicos: o modelo directo, onde os embriões têm origem directa no explante utilizado, sem formação de um estágio e/ou tecido intermediário - calo -; e o modelo indirecto, no qual os embriões surgem a partir de um tecido intermediário caloso que apresenta células em diferentes fases de desenvolvimento e diferenciação. Esta primeira de indução é despoletada por diferentes rácios de reguladores de crescimento, nomeadamente auxinas e citocininas. Na fase de multiplicação o nível de auxinas deverá ser muito baixo e na fase de maturação deverá ser inexistente, dando assim origem a embriões somáticos maduros. As auxinas actuam durante o crescimento celular ao estimular a acidificação da parede, que resulta na extensibilidade desta e ao induzir a transcrição de RNAs mensageiros que codificam proteínas associadas ao crescimento celular (Richard *et al.*, 2002). As citocininas participam no crescimento celular, nomeadamente ao nível da divisão celular, dominância apical, formação e regeneração de tecidos e desenvolvimento vascular (Kurakawa *et al.*, 2007). Na fase de maturação são manipulados o tipo e concentração de reguladores de crescimento, principalmente agentes de maturação como o ABA, agentes osmóticos (como PEG) e carvão activado (Lakshmanan, 2006). Estes agentes são importantes para simular a dissecação necessária à maturação dos embriões por criação de um gradiente osmótico (PEG), actuar ao nível da síntese de proteínas de resposta ao stress (ABA) ou para adsorver moléculas inibidoras da maturação ou reguladores de crescimento residuais (carvão activado) (Macedo, 2010).

No género *Eucalyptus*, o processo de embriogénese somática foi descrito pela primeira vez em 1980, por Ouyang *et al.*, onde foi conseguida a embriogénese somática e regeneração de plantas a partir do híbrido "*E. x liechow*", obtendo-se calos a partir de plântulas (segundo Le Roux and Van Staden 1991). Desde então muitos outros trabalhos foram descritos, em várias espécies como *E. globulus* (Trindade, 1996; Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Nugent *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002; Oller *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2011), *E. grandis* (Watt *et al.* 1991), *E. dunni* (Termignoni *et al.* 1996), *E. nitens* (Bandyopadhyay *et al.* 1999), *E. tereticornis* (Prakash e Gurumurthi 2005) e *E. camaldulensis* (Prakash e Gurumurthi, 2010).

Mais recentemente Pinto *et al.* (2008) estudaram vários factores que poderiam estar associados às baixas taxas de indução da embriogénese somática em *Eucalyptus globulus*. Concluíram que o tipo de meio (os melhores resultados foram obtidos com o meio MS e B5) e os agentes antioxidantes podem afectar a embriogénese somática. A maioria dos

antioxidantes utilizados decresciam o potencial de embriogénese somática enquanto apenas o DTE, carvão activado e nitrato de prata reduziram o escurecimento, resultante da oxidação dos explantes.

Prakash e Gurumurthi (2010) avaliaram os efeitos de outros factores, como o tipo e idade dos explantes, combinações de factores de crescimento e a força do meio, na regeneração e embriogénese somática de *E. camaldulensis*. Os melhores resultados de formação de calo foram obtidos com meio MS e 1mg/L de NAA, observando-se também que a idade dos explantes influencia este parâmetro, já que se verificaram melhores resultados com explantes mais jovens. Relativamente ao tipo de explantes foram os embriões zigóticos que apresentaram melhores resultados de desenvolvimento de calos. Também foram avaliados os efeitos das diferentes concentrações de sacarose, força do meio e presença de ABA na maturação dos embriões somáticos e germinação, observando-se que o número de embriões maduros aumentava com as concentrações mais baixas de ABA, que as concentrações mais elevadas de sacarose estão associadas a uma taxa inferior de embriões somáticos maduros e que esta mesma taxa era mais elevada com maiores diluições do meio.

Em 2011, Andrade *et al.* estudaram a embriogénese somática como ferramenta potencial para melhoramento de espécies florestais, em *E. globulus*. Ao avaliar o tipo de explante observaram que, como previamente reportado para outras espécies, quando utilizados cotilédones ou hipocótilos não se obtia resposta embriogénica, observando-se apenas formação de calos e raízes. No entanto, quando se usavam embriões zigóticos como explantes, 5 a 20% destes apresentavam formação de embriões somáticos globulares, após transferência para meio de expressão. Os dados obtidos de taxas de indução são consistentes com os dados adquiridos anteriormente, demonstrando a importância do genótipo. Conseguiram ainda concluir que a presença de raízes e pêlos radiculares ocorreu em todos os tratamentos realizados e que, ao adicionar diferentes vitaminas ao meio MS não havia diferenças na resposta embriogénica. A principal conclusão deste trabalho é a evidente reproducibilidade do protocolo anteriormente utilizado, indicando também a importância do genótipo nas condições de cultura no sucesso da indução.

1.4.2. Organogénese

A regeneração de plantas pode também ocorrer por organogénese, ou seja, a formação de estruturas unipolares (gemas caulinares ou radiculares adventícias) a partir de células somáticas (morfogenéticas). Ao contrário do que se observa em embriogénese somática, o sistema vascular destas estruturas está associado ao do explante original (Thorpe, 1994) e a origem das gemas é maioritariamente multicelular (Thorpe, 1990; Guidolin, 2003). Tal como descrito para a embriogénese somática, a resposta dos explantes

está dependente da presença de reguladores de crescimento, nomeadamente do rácio entre a concentração de citocininas e auxinas, aplicadas exogenamente (Moreira-Dias *et al.*, 2000; Stewart 2008). Estas substâncias podem afectar vários mecanismos celulares ou modificar a síntese, degradação, activação, sequestro ou mesmo o transporte de reguladores de crescimento endógenos (Gasper *et al.*, 1996), tendo assim uma importância fundamental na competência dos tecidos morfogénéticos (Kerbaudy, 1999). As citocininas promovem a divisão celular e estimulam a iniciação e o crescimento de gemas adventícias, sendo 6-benzylaminopurina, ou BA, a citocinina mais adequada para indução de gemas adventícias (Beyl 2000; Girijashankar, 2012). Os reguladores de crescimento naturais, como BA, são metabolizados mais rápido e facilmente em plantas do que os reguladores de crescimento sintéticos, o que pode levar ao aumento da eficiência da regeneração (Grattapaglia e Machado, 1998).

Além da presença e concentrações dos reguladores de crescimentos aplicados exogenamente, o sucesso da organogénese está dependente de muitos outros factores como o genótipo, o tipo, idade e tamanho dos explantes, os meios de cultura e as condições de cultura (Thorpe, 1994; Moreira-Dias *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005).

O processo organogenético ocorre em três fases: numa primeira fase as células tornam-se competentes, desdiferenciando-se de seguida. Numa terceira fase dá-se a rediferenciação e morfogénese, independente da presença de reguladores de crescimento exógenos (Sugiyama, 1999).

A organogénese pode ser directa ou indirecta. Na organogénese directa a formação de gemas ocorre directamente a partir do tecido utilizado como explante, sem fase intermédia de produção de calo. Este sistema de regeneração tem sido principalmente usado para propagação clonal (Stewart, 2008).

Na organogénese indirecta, a formação de gemas ocorre indirectamente após uma fase de produção de calo (massas de células indiferenciadas), ou seja, a gema tem origem no calo e não directamente das células do explante. A indução de organogénese indirecta não garante fidelidade clonal, mas pode ser o sistema ideal para a multiplicação em massa. A organogénese indirecta é o sistema de regeneração tipicamente mais utilizado para a produção de plantas transgénicas.

A complexidade do processo organogenético, a dependência de múltiplos factores para o seu sucesso e a necessidade de melhoramento genético florestal em espécies do género *Eucalyptus* continuam a motivar muitos dos estudos mais recentes.

Em 2012, Brondani e colaboradores procederam a estudos de regeneração *in vitro* em *Eucalyptus grandis*, com o objectivo de compreender os efeitos da presença de boro e

cálcio na indução de gemas adventícias. Neste estudo foram utilizados segmentos nodais como explante e ao fim de 60 dias de cultura em meio MS suplementado com diferentes combinações de boro e cálcio, os autores concluíram que estas concentrações influenciaram o controlo organogénico *in vitro* nesta espécie, favorecendo a indução de gemas (Brondani *et al.*, 2012).

Ouyang e colaboradores (2012) descreveram a regeneração eficiente via organogénese no híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Segmentos de caule foram utilizados como explante, bem como meio MS, suplementado com N-fenil-N'-[6-(2-clorobenzotiazol)-il] ureia (PBU), um derivado sintético de fenil-ureia utilizado como regulador de crescimento com actividade semelhante à das citocininas, e IAA. Os autores concluíram que o PBU pode ser um regulador de crescimento útil, já que os dados indicam que estimularam produção de cali mais vigorosos e menos oxidados, produzindo mais gemas adventícias.

Girijashankar (2012) apresentou recentemente um novo protocolo de regeneração *in vitro* em *Eucalyptus camaldulensis* via organogénese directa, usando segmentos nodais como explante e meio MS suplementado com BAP e NAA. A importância deste trabalho foi a optimização deste sistema, por manipulação dos reguladores de crescimento, tipo de explante e tipo de meio de cultura, em *E. camaldulensis*, potenciando assim a minimização da ocorrência de variações somaclonais (Girijashankar, 2012).

1.5. Transformação genética em plantas

A definição mais aceite de transformação genética de plantas é a “introdução de transgenes em células, tecidos ou órgãos vegetais, por aplicação de meios directos ou indirectos desenvolvidos pela biologia molecular e celular” (Jenes *et al.*, 1993), mas apenas os eventos integrativos, confirmados por análise genética e molecular, é que são correctamente designados por transformação genética (Potrykus, 1991; Birch, 1997).

Para o sucesso da transformação genética são necessários vários requisitos, nomeadamente:

- a) material vegetal com capacidade de transformação e regeneração;
- b) disponibilidade de marcadores de selecção ou genes repórter sem efeitos adversos na regeneração das células transformadas;
- c) existência de um sistema de regeneração eficaz que permita a obtenção de um elevado número de plantas transformadas;

d) período de tempo curto para a recuperação de plantas transgênicas, de modo a minimizar os efeitos indesejáveis provenientes da variação somaclonal em sistemas de cultura de células de longo prazo;

e) método de transformação (idealmente) independente do genótipo, potenciando a eficaz transformação de diferentes variedades (Christou, 1994).

Os métodos de introdução de DNA em plantas são variados e dependem principalmente do material escolhido para o estudo (Stewart, 2008). Esses métodos podem ser directos (físicos ou químicos), como biolística, microinjecção, electroporação, transformação de protoplastos, mediada por PEG (polietilenoglicol) ou fosfato de cálcio e transformação com fibras de carbeto de sílcio (Afroz, 2010); ou indirectos, onde a introdução de DNA é mediada por um vector biológico, como é exemplo a transformação por *Agrobacterium*. Este método é usado preferencialmente para a produção de plantas transgênicas, excepto em plantas (como algumas monocotiledóneas) recalcitrantes à infecção por estas bactérias, recorrendo-se então a técnicas de biolística (Wadl, 2005; Stewart, 2008).

A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria Gram-negativa do solo, naturalmente patogénica, que causa uma doença denominada “galha da coroa”, promovendo a formação de tumores nas zonas de infecção em várias espécies de plantas dicotiledóneas. Durante a infecção o T-DNA (“transfer DNA”), um segmento móvel do plasmídeo Ti, é transferido para o núcleo da célula da planta e integrado no seu genoma (Wadl, 2005).

A transformação mediada por *Agrobacterium* oferece várias vantagens como a possibilidade da transferência de uma ou poucas cópias de um fragmento de DNA contendo o gene de interesse, com maior eficácia e menores custos, quando comparado com os métodos de transferência directa de genes como a biolística e a electroporação (Afroz, 2005). A eficiência da transformação é influenciada por uma série de factores como o genótipo vegetal usado, o tipo de explantes, o tipo de vector e plasmídeo, estirpe bacteriana, adição de compostos fenólicos sintéticos indutores dos genes de virulência (acetosseringona), composição do meio de cultura e danos nos tecidos vegetais (Uranbey *et al.*, 2005; Afroz, 2010). A estabilidade do processo de transformação necessita, na grande maioria dos casos, da ocorrência de dois processos biológicos independentes: a inserção estável do transgene no genoma da planta e a regeneração das células transformadas, produzindo assim plantas transgênicas não-quiméricas.

A necessidade da obtenção de plantas transgênicas, por diferentes metodologias, e a elevada importância económica do género *Eucalyptus* justificam os vários trabalhos que já foram publicados com diferentes espécies, representadas na Tabela 3. A obtenção de plantas transgênicas de *Eucalyptus* poderá potenciar a melhoria da qualidade ou quantidade dos produtos florestais obtidos, o que tem grande interesse para as indústrias dependentes destes como matéria-prima.

Tabela 3 – Resumo de alguns trabalhos realizados no âmbito da transformação de várias espécies do género *Eucalyptus*.

Espécie	Referência	Espécie	Referência
<i>E. gunni</i>	Teulieres <i>et al.</i> 1991	<i>E. nitens</i>	Macrae e Van Staden, 1993 Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 1999
<i>E. citriodora</i>	Manders <i>et al.</i> , 1992	<i>E. globulus</i>	Rochange <i>et al.</i> 1995 Serrano <i>et al.</i> , 1996 Moralejo <i>et al.</i> , 1998 Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 1999 Kawazu US Patent: 65630242003 Spokevicius <i>et al.</i> , 2005 Van Beveren <i>et al.</i> , 2006 Spokevicius <i>et al.</i> , 2007a Taylor <i>et al.</i> , 2007
<i>E. grandis</i>	Macrae e Van Staden, 1993 Kawazu US Patent: 65630242003 Shani <i>et al.</i> , 2003 Yao, 2005 Patent: US 2005/0086714 A1	<i>E. camaldulensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 1996 Mullins <i>et al.</i> , 1997 Ho <i>et al.</i> , 1998 Harcourt <i>et al.</i> , 2000 Chen <i>et al.</i> , 2001 Kawazu US Patent: 65630242003 Valerio <i>et al.</i> , 2003 Yamada-Watanabe <i>et al.</i> , 2003 Shani <i>et al.</i> , 2003 Kawaoka <i>et al.</i> , 2003, 2006 Quisen, 2007 Lelmen <i>et al.</i> , 2010
<i>E. dunnii</i>	Macrae e Van Staden, 1993		
<i>E. grandis x urophylla</i>	Machado <i>et al.</i> , 1997 Sartoretto <i>et al.</i> , 2002 Gonzalez <i>et al.</i> , 2002 Tournier <i>et al.</i> , 2003 Kawazu US Patent: 65630242003 Kawazu <i>et al.</i> , 2003 Suzuki <i>et al.</i> , 2004 Cheng, 2006		
<i>Eucalyptus sp.</i>	Kondo <i>et al.</i> , 2003 Ishige <i>et al.</i> , 2004		
<i>E. tereticornis</i>	Prakash e Gurumurthi, 2009		
<i>E. saligna</i>	Cheng, 2006 Dibax <i>et al.</i> , 2010		
<i>E. urophylla</i>	Shao <i>et al.</i> , 2002 Cheng, 2006		

A título de exemplo, Dibax e colaboradores (2010) descrevem a transformação da *Eucalyptus saligna* mediada pelo *Agrobacterium tumefaciens*. Com o objectivo de aumentar a resistência ao frio nesta espécie, os autores introduziram no genoma desta planta o gene *P5CSF129A*, que codifica uma enzima chave na biossíntese de prolina (*P5CS*). As plantas transgênicas apresentavam folhas com concentrações de prolina quatro vezes superiores às verificadas nas plantas não transformadas, enquanto nas raízes não se verificaram alterações. Este foi o primeiro estudo em que a organogénese foi induzida a partir de explantes cotiledonares e foliares em *E. saligna*, tendo os autores conseguido obter uma eficiência de transformação de 0,5%.

Em 2011, Alcantara *et al.* descreveram a organogénese e transformação transiente no híbrido *E. grandis* × *E. urophylla*, usando diferentes tipos de explantes e condições, o que permitiu a avaliação dos factores que afectam a transformação genética. As melhores condições para a expressão do gene integrado, o gene repórter *uidA*, foram obtidas com 3 dias de co-cultura com a bactéria e mediante a adição de acetoseringona nos meios de pré e co-cultura.

Também em 2011, Deepika e colaboradores elaboram um protocolo optimizado para a regeneração e transformação genética para genótipos clonais do género *Eucalyptus*. Para alcançar este objectivo, os autores avaliaram o efeito do genótipo na regeneração de gemas adventícias transgénicas, usando oito clones de *Eucalyptus* e avaliaram os efeitos da adição de PVP, observando minimização da oxidação dos compostos fenólicos libertados pelos tecidos (potencia taxas de regeneração de tecido transgénico mais elevadas).

1.6. Objectivos

O objectivo do presente trabalho é contribuir com novo conhecimento e novas metodologias que permitam a regeneração e transformação em *Eucalyptus grandis*, uma vez que é uma das espécies de *Eucalyptus* com maior interesse económico a nível mundial. Pretende-se que estes novos dados possam contribuir para o desenvolvimento de um método de regeneração e transformação eficiente nesta espécie.

Neste contexto, os principais objectivos deste trabalho são a regeneração, via embriogénese somática ou organogénese, e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Eucalyptus grandis*. Os objectivos específicos são:

- O estudo do potencial da espécie para regeneração via embriogénese somática, através da manipulação de diferentes factores: tipo de explante, combinação de reguladores de crescimento, tipo de meio, força do meio e tipo de agente solidificante.
- O estudo do potencial da espécie para regeneração via organogénese, através da manipulação de factores como a combinação de reguladores de crescimento, tipo de meio e condições de luminosidade
- Transformação de explantes foliares e regeneração de tecidos transgénicos, optimizando-se, para tal, a concentração necessária de canamicina para selecção destes.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

2.1.1. Micropropagação

Neste trabalho foram utilizadas culturas *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, genótipo BRZ1, gentilmente cedidas pelo Doutor Jorge Paiva, Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa. Os rebentos de *E. grandis* (BRZ1) são mantidos e micropropagados assepticamente em meio de micropropagação (MS (Murashige e Skoog, 1962), 30g/L de sacarose, 0,5g/L de PVP e 7g/L de microagar, sendo o pH ajustado para 5,8; após autoclavagem os meios foram suplementados com 0,2mg/L de BA e 0,01mg/L de NAA) através da subcultura de segmentos caulinares (entrenós), em intervalos regulares de 4 semanas. As culturas *in vitro* foram mantidas em câmara de crescimento (PHYTOTRON EDPA 700, ARALAB) com fotoperíodo de 16 horas e luz fluorescente branca com $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura dia/noite de 24/22°C.

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho foram esterilizados por autoclavagem a 110°C durante 30 minutos. Todos os reguladores de crescimento e o antioxidante DTT foram esterilizados por filtração (filtros de 0,2µm Whatman).

2.1.2. Embriogénese somática

As culturas foram iniciadas utilizando como explantes folhas e segmentos de caules provenientes de plântulas micropropagadas e com segmentos de raízes obtidas por organogénese (obtidas 2 meses após inoculação de folhas e segmentos de caule em meio MS suplementado com NAA 2mg/L ou 3mg/L).

Neste ensaio, os explantes foram inoculados em meio sólido para a indução de embriões somáticos (meio basal, 30g/L sacarose, 5mg/L de DTT, pH= 5,8 e agente solidificante). Para cada condição testada foram usados três a dez explantes por placa, sendo efectuadas três réplicas técnicas (placas). Foram testadas duas formulações de meios de cultura base (MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1980)), diferentes agentes gelificantes (7g/L microagar ou 2g/L gelrite) e diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, descritas na tabela 6.

A indução de embriogénese somática nos tratamentos T1 a T29 foi feita em condições de escuridão (23°C) durante 30 dias, findo os quais os explantes foram transferidos para novo meio de cultura (MS ou MS/2), sem suplementação de reguladores de crescimento. Nos tratamentos T40 a T46, submeteram-se os explantes a escuridão, durante 2 semanas, sendo 2 das 3 réplicas transferidas posteriormente para câmara de

crescimento (fotoperíodo de 16 horas e luz fluorescente branca com $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura dia/noite de 24/22°C).

2.1.3. Organogénese

As culturas foram iniciadas utilizando folhas excisadas de plântulas micropropagadas. Os explantes foram inoculados em meio sólido para a indução de organogénese (meio basal, 30g/L sacarose, 5mg/L de DTT, pH= 5,8 e 2g/L de microagar). Para cada condição testada foram usados 10 explantes, sendo efectuadas 3 réplicas técnicas (placas). Foram testadas duas formulações de meios de cultura base (MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1980)), suplementado com 7g/L de microagar e diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, descritas na tabela 8.

Para a indução de organogénese, os explantes foram submetidos a escuridão, durante 2 semanas, sendo posteriormente transferidos para câmara de crescimento (fotoperíodo de 16 horas e luz fluorescente branca com $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura dia/noite de 24/22°C).

Dois meses após inoculação dos explantes, as plântulas regeneradas foram isoladas em frascos com o mesmo meio utilizado na micropropagação (MS ou WPM, suplementado com 30g/L de sacarose, 5mg/L de DTT (adicionado após autoclave) e 7g/L de microagar, com pH ajustado para 5,8; após autoclave foram suplementados com 0,2mg/L de BA e 0,01mg/L de NAA). Aproximadamente após mês e meio, foram transferidas para meio de enraizamento (meio WPM, suplementado com 30g/L de sacarose e 7g/L de microagar, com pH ajustado para 5,8; após autoclave foram suplementados com 5mg/L de DTT, 0,01mg/L de BA e 0,5mg/L de NAA).

2.2. Optimização da concentração de canamicina usada em transformação

Para avaliar qual a concentração de canamicina adequada para a selecção de tecidos transgénicos de *Eucalyptus grandis*, foram utilizados explantes provenientes de rebentos micropropagados *in vitro*. Estes foram inoculados em meio de indução de raízes (MS, 30g/L sacarose, 5mg/L de DTT, 2mg/L de NAA, 7g/L de microagar, pH=5,8) suplementado com concentrações crescentes de canamicina: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 e 100mg/L. Os explantes foram colocados em condições controladas de escuridão (câmara de crescimento a 23°C). O meio foi renovado semanalmente, para manutenção da pressão selectiva. O efeito da canamicina sobre a capacidade de regeneração de raízes bem como viabilidade dos explantes foi avaliado após 30 dias.

2.3. Transformação de *Eucalyptus grandis*

A estirpe EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Hood *et al.*, 1993) foi seleccionada e usada em todas as experiencias de transformação descritas. Para otimizar o protocolo de transformação foram utilizadas células de *A. tumefaciens* transformadas com o plasmídeo pMP2482 (Quaadvlieg *et al.*, 1998). Este plasmídeo contém a fusão dos genes *gusA::intr* e *gfp*, sobre controlo do promotor CaMV35S, com sequências enhancer de iniciação duplicadas.

2.4. Confirmação da presença da construção p35sGusInt GFP em *A. tumefaciens*

A confirmação da presença do plasmídeo pMP2482, em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foi testada via amplificação por PCR. Nas colónias contendo o plasmídeo de interesse, deverá ser visualizado um produto de amplificação de 900bp correspondendo a uma parte da sequência do gene *gus*.

Foi feito um riscado com a finalidade de isolar colónias de EHA105. Uma vez isoladas, foram retiradas amostras, com um palito, e inocularam-se placas de petri com 25ml de meio LB sólido, suplementado com 100mg/L de canamicina e 50mg/L de rifampicina, submetidas a câmara escura a 27°C, durante aproximadamente 3 dias. Seis colónias individualizadas foram testadas para a presença de parte da sequência do gene *gus* por PCR. As colónias foram inoculadas em tubos Falcon com 5ml de meio LB líquido, suplementado com 100mg/L de canamicina e 50mg/L de rifampicina, colocados em agitação (200rpm), a 27°C durante 2 dias. Os reagentes e as condições para a amplificação por PCR estão descritos nas Tabelas 4 e 5. Como template foram usados 5 ou 1µl (amplificação 1 e 2, respectivamente) de suspensão bacteriana. Os produtos de amplificação foram visualizados após electroforese. Os géis para electroforese foram preparados com agarose a 2% diluída em tampão Tris-Borato EDTA (TBE: 1mM de EDTA, 44,6µm de ácido bórico, ph=8) 0,5x. De forma a avaliar a dimensão dos produtos de amplificação foi utilizado o marcador de pesos moleculares 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™, EUA). As corridas foram efectuadas sob uma voltagem de 100V, durante aproximadamente 20 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados sob luz UV adicionou-se 10µl/L de SYBR Safe. As fotografias foram capturadas com recurso ao sistema Gel Doc 1000 da BioRad® (EUA) e respectivo software.

2.5. Análise PCR

O segmento de DNA, de aproximadamente 900bp, que corresponde a parte da sequência do gene *gus*, foi amplificado combinando os primers e com os vários reagentes

descritos na Tabela 4. A sequência dos primers é 5' CAAGGCACTAGCGGGACTTT 3' (primer forward) e 5' GCCATGCACACTGATACTCTTC 3' (primer reverse). Foi usado, como controlo positivo, uma solução com o plasmídeo pMP2482, com a mesma construção utilizada na transformação; como controlo negativo utilizou-se a mistura de reacção sem template.. A reacção deu-se num termociclador Biometra ® UNO II, com o programa de PCR descrito na Tabela 5.

Tabela 4 – Volume utilizado dos reagentes para a reacção e amplificação por PCR.

Reagente	Amplificação 1 (μ l)	Amplificação 2 (μ l)
H ₂ O	10,24	14,44
Buffer	4	4
MgCl ₂	1,6	1,6
dNTP	1	1
Primer F	0,5	0,4
Primer R	0,5	0,4
Taq Pol.	0,16	0,16
Template	5	1
Volume Final	23	23

Tabela 5 – Programa definido para a amplificação por PCR. São discriminados os tempos e temperaturas necessários a cada fase do processo.

Processo	Desnaturaçãoinicial	34 ciclos			Extensão final
		Desnaturaçãoinicial	Emparelhamentode primers	Extensão	
Temperatura (°C)	98	94	60	72	72
Tempo	2 minutos	50 segundos	1 minuto	50 seg.	3 minutos

2.6. Preparação de *Agrobacterium tumefaciens* para transformação

Após confirmação da presença do plasmídeo de interesse, uma das colónias seleccionadas foi inoculada em meio 5ml de LB líquido, suplementado com 100mg/L de canamicina e 50mg/L de rifampicina. Após uma incubação às escuras overnight, a 28°C e em agitação de 200rpm, a cultura bacteriana foi diluída 1:100 em meio LB e novamente incubada overnight nas condições descritas anteriormente. Para precipitar as células, a cultura foi centrifugada durante 7 minutos a 5000rpm e o precipitado bacteriano foi ressuspenso em meio de cultura MS líquido, suplementado com 100 μ M de acetoseringona e 2mg/L de NAA. As bactérias foram ressuspendidas em meio de cultura até atingir uma densidade óptica de aproximadamente $A_{600nm}=1,5$ (Ultrospec 4000, Pharmacia Biotech). Para activação dos mecanismos de virulência do *A. tumefaciens*, a cultura bacteriana foi incubada 30 minutos ao escuro, antes de proceder à infecção dos explantes vegetais.

2.7. Co-cultura de explantes foliares e *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação, foram utilizados explantes foliares provenientes de plantas micropropagadas *in vitro*. Os explantes foram colocados em papel absorvente esterilizado, humedecido com água bidestilada estéril, para evitar desidratação dos tecidos, e foram feitos cortes perpendiculares ao veio central da folha, usando um bisturi previamente mergulhado na suspensão de EHA105, sendo posteriormente transferidos para meio de indução de raízes (MS sólido, suplementado com 5mg/L de DTT, 2mg/L de NAA) e 100 µM de acetoseringona. Aproximadamente 130 explantes foliares foram co-cultivados com *A.tumefaciens* contendo o plasmídeo pMP2482 e 20 foram mantidos não infectados como controlo da experiência de transformação.

2.8. Selecção de tecidos transgénicos e indução de raízes

Após co-cultura de 7 dias, em câmara de crescimento a 23°C, no escuro, os explantes foram transferidos para meio de indução de raízes suplementado com 10mg/L de canamicina para selecção para tecidos transgénicos e 500mg/L de carbenicilina, para eliminação da bactéria. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento ao escuro, a 23°C, durante aproximadamente 2 meses. As culturas foram subcultivadas para novos meios semanalmente para manutenção da pressão selectiva sobre os explantes até à obtenção de raízes. Como controlo para avaliar a eficácia do método de selecção e processo de regeneração de raízes, submeteram-se folhas não infectadas às mesmas condições de pressão selectiva, descritas anteriormente.

2.9. Detecção da expressão da construção inserida

2.9.1. Análise histoquímica da actividade da β- glucuronidase

A análise da actividade da β- glucuronidase (GUS) foi feita de acordo com o procedimento descrito por Jefferson *et al.* (1987), usando como substrato X-GlcA (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-**glucurónico**). Utilizou-se uma solução consituída por 1mM X-GlcA diluído em 50 mM buffer de fosfato de sódio, a pH 7.0, 10 mM EDTA e 0.1% (v/v) de Triton X-100). Os explantes infectados e não infectados foram submersos com esta solução, procedendo-se à infiltração por vácuo, a 0,6 bar durante aproximadamente 30 minutos. A reacção foi incubada a 37°C, numa câmara húmida, durante 24 horas. O excesso de clorofila foi removido dos explantes com etanol a 70% (v/v).

2.9.2. Detecção da expressão de GFP

Os explantes que demonstraram regeneração de raízes foram analisados por microscopia de fluorescência. Como controlo negativo, observaram-se segmentos de raízes obtidos de plântulas regeneradas enraizadas (raízes não transformadas com a construção anteriormente descrita. Tanto as raízes transgénicas como as raízes controlo foram observadas com um microscópio de epifluorescência equipado com filtros de excitação e emissão (filtro de excitação 480/40nm; filtro de barreira B2A).

A detecção da expressão da GFP foi feita recorrendo a um microscópio invertido de epifluorescência (Nikon TE2000-S, Tokyo), com câmara de vídeo acoplada. As imagens digitais capturadas foram processadas pelo software de análise de imagens Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics, Bethesda, MD).

2.10. Análise de resultados e registo fotográfico

Todos os resultados obtidos foram analisados com uma lupa Leica MZ6 e o registo de fotografias ampliadas foi feito numa lupa Leica WILD MZ8, com câmara acoplada (Leica DC 200), com o software Leica IM50. A aquisição de imagens fotográficas digitais foi efectuada com auxílio de uma Fujifilm FinePix S3300.

3. Resultados

3.1. Embriogénese somática

Todas as observações, resultados e fotografias foram recolhidas um mês após a inoculação dos explantes nas condições a testar. A resposta dos explantes aos tratamentos, tanto sobre a forma de formação de calos como a formação de raízes, sendo calculadas as percentagens de formação de calos e/ou raízes (percentagem de explantes em que ocorreu proliferação de calos ou de raízes). Estes dados estão descritos na Tabela 6. Os resultados obtidos referentes a uma quantificação visual do grau de desenvolvimento de calo, raízes e formação de embriões somáticos estão esquematizados na Tabela 7.

3.1.1. Indução de calos

De acordo com a Tabela 6 e 7, não foi observada a formação de calos apenas nos tratamentos T1, T6, T11, T16 (sem suplementação de reguladores de crescimento) (Fig.2b), T12 e T17 (suplementação com BA). Os tratamentos com maior proliferação de calos foram os meios que incluíam concentrações de NAA entre os 0,5 e 3mg/L (Fig. 2c, 2d, 2e, 2f e 2h). Este efeito positivo no desenvolvimento de calo é observado quer o NAA seja aplicado individualmente (Figura 2c e 2d) ou quer em combinação com 2,4-D (Fig.2e) ou 2,4-D e zeatina (Fig.2f e 2h). O aumento da concentração de NAA parece potenciar o grau de proliferação de calo. Também a percentagem de formação de calos é maior nestes tratamentos, aproximando-se de 100% em todos os meios e tipo de explantes testados, com excepção dos tratamentos T21, T22, T24, T27, T28, T29, T40, T42 (quando utilizados explantes foliares). Os melhores resultados em formação e desenvolvimento de calos obtiveram-se nos tratamentos T4 (Fig.2e), T5 (Fig.2f e 2h), T9 e T10. As percentagens de formação de calo aproximam-se de 100% e o desenvolvimento dos calos é bom (+++++) ou muito bom (++++). Não se observaram diferenças significativas entre tratamentos com agentes solidificantes diferentes (MS com microagar ou gelrite) ou diferenças relativas referentes ao tipo de explante utilizado.

Nos tratamentos T21, T22, T44, T23, T45, T24, T25 e T26, não se observa desenvolvimento considerável dos calos, à excepção dos calos que cresceram em T45, T46 e T24 (concentrações de 2,4-D mais elevadas), apresentando desenvolvimento razoável a bom. Entre estes tratamentos (T21, T22, T44, T23, T45, T24, T25 e T26) observam-se diferenças ao nível do tipo do explante: os explantes caulinares apresentam melhores desenvolvimentos de calos.

O desenvolvimento de calos mais fraco observou-se nos tratamentos suplementados apenas com zeatina (T27, T28 e T29) e em T13 e T18 (0,05mg/L de BA e 0,1mg/L de IBA).

Tabela 6 – Percentagem de resposta associada à formação de calos e raízes nas diferentes condições experimentais testada para indução da embriogênese somática.

Trat.	Suplementos	Meio	Tipo explante	Número de explantes testados	% de formação de cali	% de formação de raízes
T1/T11	0	MS (Gelrite)	Folha	15/15	0	0
			Caule	15/9	0	0
T6/T16		MS (Agar)	Folha	21/15	0	0
			Caule	15/9	0	0
T40	NAA (0,5mg/L)	WPM (Agar)	Folha	30	20	26,7
T41	NAA (1mg/L)	WPM (Agar)	Folha	30	76,7	56,7
T2	NAA (2mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	93,3	66,7
			Caule	15	100	60
T7		MS (Agar)	Folha	19	100	78,9
			Caule	16	100	100
T42		WPM (Agar)	Folha	30	40	83
T3	NAA (3mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	10	100	90
			Caule	10	90	70
T8		MS (Agar)	Folha	19	94,7	47,4
			Caule	15	93,3	60
T14	NAA (0,1mg/L) + 2,4-D (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	*	*
			Caule	9	*	*
T19		MS (Agar)	Folha	15	*	*
			Caule	9	*	*
T15	NAA (0,5mg/L) + 2,4-D (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	*	*
			Caule	9	*	*
T20		MS (Agar)	Folha	15	*	*
			Caule	9	*	*
T4	NAA (1mg/L) + 2,4-D (1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	100	46,7
			Caule	15	100	6,7
T9		MS (Agar)	Folha	15	100	6,7
			Caule	15	100	0
T43		WPM (Agar)	Folha	30	87	60
T5	NAA (1mg/L) + 2,4-D (1mg/L) + Zea (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	100	0
			Caule	15	100	0
T10		MS (Agar)	Folha	10	100	0
			Caule	10	100	0
T12	BA (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	0	0
			Caule	9	0	0
T17		MS (Agar)	Folha	15	0	0
			Caule	9	0	0
T13	BA (0,05mg/L) + IBA (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	*	*
			Caule	9	*	*
T18		MS (Agar)	Folha	15	*	*
			Caule	9	*	*
T21	2,4-D (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	33,3	13,3
			Caule	9	100	0
T22	2,4-D (0,5mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	10	30	0
			Caule	9	100	0
T44		WPM (Agar)	Folha	30	83	70
T23	2,4-D (1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	66,7	0
			Caule	9	100	0
T45		WPM (Agar)	Folha	30	97	30
T46	2,4-D (2mg/L)	WPM (Agar)	Folha	30	100	0

T24	2,4-D (2,5mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	20	0
			Caule	9	100	0
T25	2,4-D (0,1mg/L) + Zea (0,2mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	10	90	0
			Caule	6	100	0
T26	2,4-D (0,25mg/L) + Zea (0,5mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	66,7	0
			Caule	9	100	0
T27	Zea (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	26,7	0
			Caule	9	100	0
T28	Zea (0,2mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	20	0
			Caule	9	100	0
T29	Zea (0,5mg/L)	MS (Gelrite)	Folha	15	46,7	0
			Caule	9	100	0

Verificou-se ainda que a resposta dos dois tipos de explante em T27, T28 e T29 era diferencial, obtendo-se maiores percentagens de formação de calos em explantes caulinares.

3.1.2. Organogénese de raízes

Observou-se em vários tratamentos a organogénese de raízes, maioritariamente de origem indirecta (raízes com origem em calos). Em alguns tratamentos com meio WPM (microagar), onde o desenvolvimento de calos é inferior devido à exposição a fotoperíodo durante 2 semanas, verificaram-se alguns casos de organogénese de raízes.

A formação de raízes ocorre em todos os tratamentos suplementados com NAA, nomeadamente T2, T7 (Fig.2d) e T42 (2mg/L de NAA), T3 (Fig.2c) e T8 (3mg/L de NAA). Não se observaram diferenças significativas entre tratamentos com diferentes meios, à excepção de T42, já que este foi submetido a condições de luminosidade diferentes. A combinação de NAA e 2,4-D (T4, T9, T14, T15, T19, T20 e T43) (Fig.2e) ou NAA, 2,4-D e Zea (T5 e T10) (Fig.2f e 2h) parece afectar a formação de raízes, quando comparados com os tratamentos suplementados apenas com NAA. Em T4, T9, T14, T19 e T43 o desenvolvimento de raízes é muito fraco (+) ou fraco (++), enquanto em T15 e T20 o desenvolvimento de raízes é razoável (+++). Em T5 e T10 não se verifica formação de raízes.

Nos tratamentos T13 e T18 (0,05mg/L de BA e 0,1mg/L de IBA) o desenvolvimento de raízes é muito fraco. Em T44 (0,5mg/L de 2,4-D) e T45 (1mg/L de 2,4-D), verificam-se percentagens de organogénese de 30 e 70%, respectivamente, embora o crescimento das raízes seja muito fraco (+).

Quando se finalizaram todos os ensaios, não se verificaram diferenças entre os calos submetidos, durante o último mês de cultura, a meio MS ou MS/2 (meio MS com 50% da força).

Tabela 7 – Dados obtidos da resposta dos explantes nas diferentes condições, em ensaios de embriogênese somática. Legenda: 0 = não há evidência; + = desenvolvimento muito fraco; ++ = desenvolvimento fraco; +++ = desenvolvimento razoável; ++++ = bem desenvolvido; +++++ = muito bem desenvolvido; NT = não testado.

Tratamento	Suplementos	Meio	Resposta do explante	Folha	Caule	Raiz	
T1/T11	0	MS (Gelrite)	Produção de calo	0	0	NT/0	
T6/T16			MS (Agar)	Formação raízes	0	0	NT/0
				Formação ES	0	0	NT/0
		Produção de calo		0	0	NT/0	
T40		NAA (0,5mg/L)	WPM (Agar)	Formação raízes	0	0	NT/0
				Formação ES	0	0	NT/0
	Produção de calo			+	NT	NT	
T41	NAA (1mg/L)	WPM (Agar)	Formação raízes	+	NT	NT	
			Formação ES	+++	NT	NT	
			Formação ES	0	NT	NT	
T2	NAA (2mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	NT	NT	
			Formação raízes	++++	++++	NT	
			Formação ES	0	0	NT	
T7		MS (Agar)	Produção de calo	+++	+++	NT	
			Formação raízes	++++	+++++	NT	
			Formação ES	0	0	NT	
T42		WPM (Agar)	Produção de calo	+	NT	NT	
			Formação raízes	++++	NT	NT	
			Formação ES	0	NT	NT	
T3	NAA (3mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++++	++++	NT	
			Formação raízes	++++	++++	NT	
			Formação ES	0	0	NT	
T8		MS (Agar)	Produção de calo	+++	+++	NT	
			Formação raízes	++++	+++	NT	
			Formação ES	0	0	NT	
T14	NAA (0,1mg/L) + 2,4-D (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++	+++	+	
			Formação raízes	++	+	+	
			Formação ES	0	0	0	
T19		MS (Agar)	Produção de calo	++	+++	+	
			Formação raízes	++	+	+	
			Formação ES	0	0	0	
T15	NAA (0,5mg/L) + 2,4-D (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++	+++	+	
			Formação raízes	+++	+++	+++	
			Formação ES	0	0	0	
T20		MS (Agar)	Produção de calo	++	+++	+	
			Formação raízes	+++	+++	+++	
			Formação ES	0	0	0	
T4	NAA (1mg/L) + 2,4-D (1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+++++	+++++	NT	
			Formação raízes	+	0	NT	
			Formação ES	0	0	NT	
T9		MS (Agar)	Produção de calo	0	0	NT	
			Formação raízes	++++	++++	NT	
			Formação ES	+	+	NT	
T43		WPM (Agar)	Formação ES	0	0	NT	
			Produção de calo	+++	NT	NT	
			Formação raízes	+	NT	NT	
			Formação ES	0	NT	NT	

T5	NAA (1mg/L) + 2,4-D (1mg/L) + Zea (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++++	++++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T10		MS (Agar)	Produção de calo	++++	++++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T12	BA (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	0	0	0
			Formação raízes	0	0	0
			Formação ES	0	0	0
T17		MS (Agar)	Produção de calo	0	0	0
			Formação raízes	0	0	0
			Formação ES	0	0	0
T13	BA (0,05mg/L) + IBA (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	++	+
			Formação raízes	+	++	++
			Formação ES	0	0	0
T18		MS (Agar)	Produção de calo	+	++	+
			Formação raízes	+	++	++
			Formação ES	0	0	0
T21	2,4-D (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	+++	NT
			Formação raízes	+	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T22	2,4-D (0,5mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++	+++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T44		WPM (Agar)	Produção de calo	++	NT	NT
			Formação raízes	+	NT	NT
			Formação ES	0	NT	NT
T23	2,4-D (1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++	+++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T45		WPM (Agar)	Produção de calo	+++	NT	NT
			Formação raízes	+	NT	NT
			Formação ES	0	NT	NT
T46	2,4-D (2mg/L)	WPM (Agar)	Produção de calo	+++	NT	NT
			Formação raízes	0	NT	NT
			Formação ES	0	NT	NT
T24	2,4-D (2,5mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	++++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T25	2,4-D (0,1mg/L) + Zea (0,2mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T26	2,4-D (0,25mg/L) + Zea (0,5mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	++	++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T27	Zea (0,1mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	+	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T28	Zea (0,2mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	+	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT
T29	Zea (0,5mg/L)	MS (Gelrite)	Produção de calo	+	++	NT
			Formação raízes	0	0	NT
			Formação ES	0	0	NT

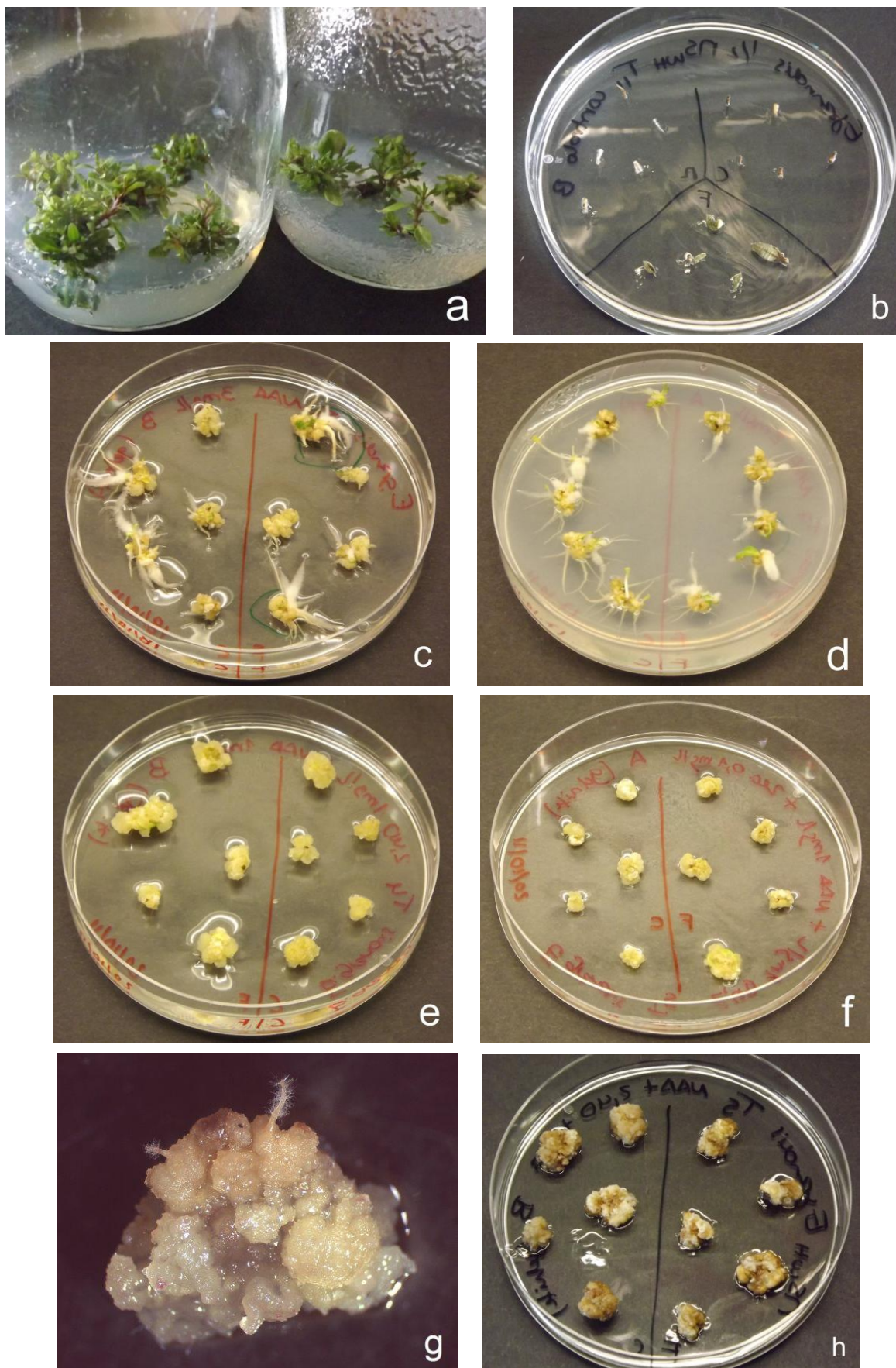


Figura 2 – Micropropagação e ensaios de embriogénese somática. **a.** Plântulas micropropagadas. **b.** Tratamento T11, sem adição de reguladores de crescimento (controlo); estão representados os 3 tipos de explantes: radicular (à esq.), caulinar (à dir.) e foliar (em baixo). **c. d. e. f.** T3 (NAA 3mg/L), T7 (NAA 2mg/L), T4 (NAA 1mg/L + 2,4-D 1mg/L) e T5 (NAA 1mg/L + 2,4-D 1mg/L + Zea 0,1mg/L), respectivamente, 1 mês após inoculação. **g.** T23 (2,4-D 1mg/L), 2 meses após inoculação em pormenor (10x). **h.** Tratamento T5, 2 meses após inoculação.

Resumindo, os resultados mostraram que os tratamentos considerados ideais para a indução de embriogénese somática são os tratamentos T5 (Fig.2f e 2h) e T10 (suplementação com 1mg/L de NAA, 1mg/L de 2,4-D e 0,1mg/L de Zea). Estes tratamentos foram seleccionados devido à resposta calogénica dos explantes (caulinares e foliares) e ausência de organogénese de raízes. Embora também apresentem boa proliferação de calos, os tratamentos suplementados com 2 e 3mg/L de NAA (Fig.2c e 2d) foram seleccionados como óptimos para organogénese de raízes. Estas condições foram posteriormente utilizadas para os ensaios de sensibilidade à canamicina e na transformação genética, com vista à produção de raízes transgénicas.

Após 2 meses de inoculação, observou-se, na maioria dos tratamentos, um aumento da oxidação dos calos (coloração acastanhada ou mesmo preta nos calos), não se verificando diferenças entre tratamentos expostos a fotoperíodo ou mantidos em escuridão (Fig.2g e 2h). Em alguns calos verificaram-se pontos avermelhados ou pequenos pontos esverdeados

Não se observaram, em nenhum dos tratamentos, quaisquer estruturas que pudessem indicar a formação de embriões somáticos.

3.2. Organogénese

A resposta dos explantes foliares aos tratamentos, tanto sobre a forma de proliferação de calos como a obtenção de gemas adventícias, está resumida na Tabela 8. Os resultados obtidos do desenvolvimento de calo e formação de gemas adventícias estão esquematizados na Tabela 9.

3.2.1. Indução de calos

De acordo com os dados das Tabelas 8 e 9, todos os tratamentos desenvolveram calos, apresentando percentagens de formação entre os 80 e 100%. Estes valores demonstram a elevada capacidade de resposta dos explantes foliares nas condições estabelecidas para proliferação de calos. No entanto o crescimento destes calos é, segundo a Tabela 9, muito fraco (+) em todos os tratamentos. Os valores mais elevados de percentagem de formação de calos observam-se nos tratamentos T34 e T39, enquanto os valores mais baixos de resposta dos explantes se verificam nos tratamentos T33 e T38 (Fig.3c). Em ambos os casos os valores mais elevados observaram-se em meio WPM.

Tabela 8 – Dados obtidos de taxa de formação de calos (em percentagem de explantes) e número de gemas adventícias obtidas, em ensaios de organogénese.

Tratamento	Suplementos	Rácio Citocinina/ Auxina	Meio	Número de explantes testados	% de formação de cali	Número de gemas obtidas
T34	NAA (0,5mg/L) + BA (0,5mg/L)	1	MS	30	100	1
T39			WPM	60	88,3	1
T32	NAA (0,5mg/L) + BA (1mg/L)	2	MS	30	83,3	4
T37			WPM	60	95,0	1
T30	NAA (1mg/L) + BA (2mg/L)	2	MS	30	93,3	9
T35			WPM	60	93,3	-
T33	NAA (0,5mg/L) + BA (2mg/L)	4	MS	30	83,3	3
T38			WPM	60	80,0	8
T31	NAA (0,1mg/L) + TDZ (0,5mg/L)	5	MS	30	86,7	2
T36			WPM	30	100	-

Tabela 9 – Dados obtidos da resposta dos explantes nas diferentes condições, em ensaios de organogénese. Legenda: + = desenvolvimento muito fraco.

Trat.	Suplementos	Rácio Citocinina /Auxina	Meio	Resposta do explante	Folha
T34	NAA (0,5mg/L) + BA (0,5mg/L)	1	MS	Produção de calo	+
T39				Gemas adventícias	Sim
T32	NAA (0,5mg/L) + BA (1mg/L)	2	WPM	Produção de calo	+
T37				Gemas adventícias	Sim
T30	NAA (1mg/L) + BA (2mg/L)	2	MS	Produção de calo	+
T35				Gemas adventícias	Sim
T33	NAA (0,5mg/L) + BA (2mg/L)	4	WPM	Produção de calo	+
T38				Gemas adventícias	Sim
T31	NAA (0,1mg/L) + TDZ (0,5mg/L)	5	MS	Produção de calo	+
T36				Gemas adventícias	Sim

3.2.2. Indução e desenvolvimento de gemas adventícias

De todos os tratamentos apenas T35 e T36 não obtiveram quaisquer gemas adventícias, enquanto os tratamentos com maior número de gemas adventícias formadas foram T30 (Fig.3a e 3b), com 9 gemas em 30 explantes, e T38 (Fig.3c e 3d), com 8 gemas

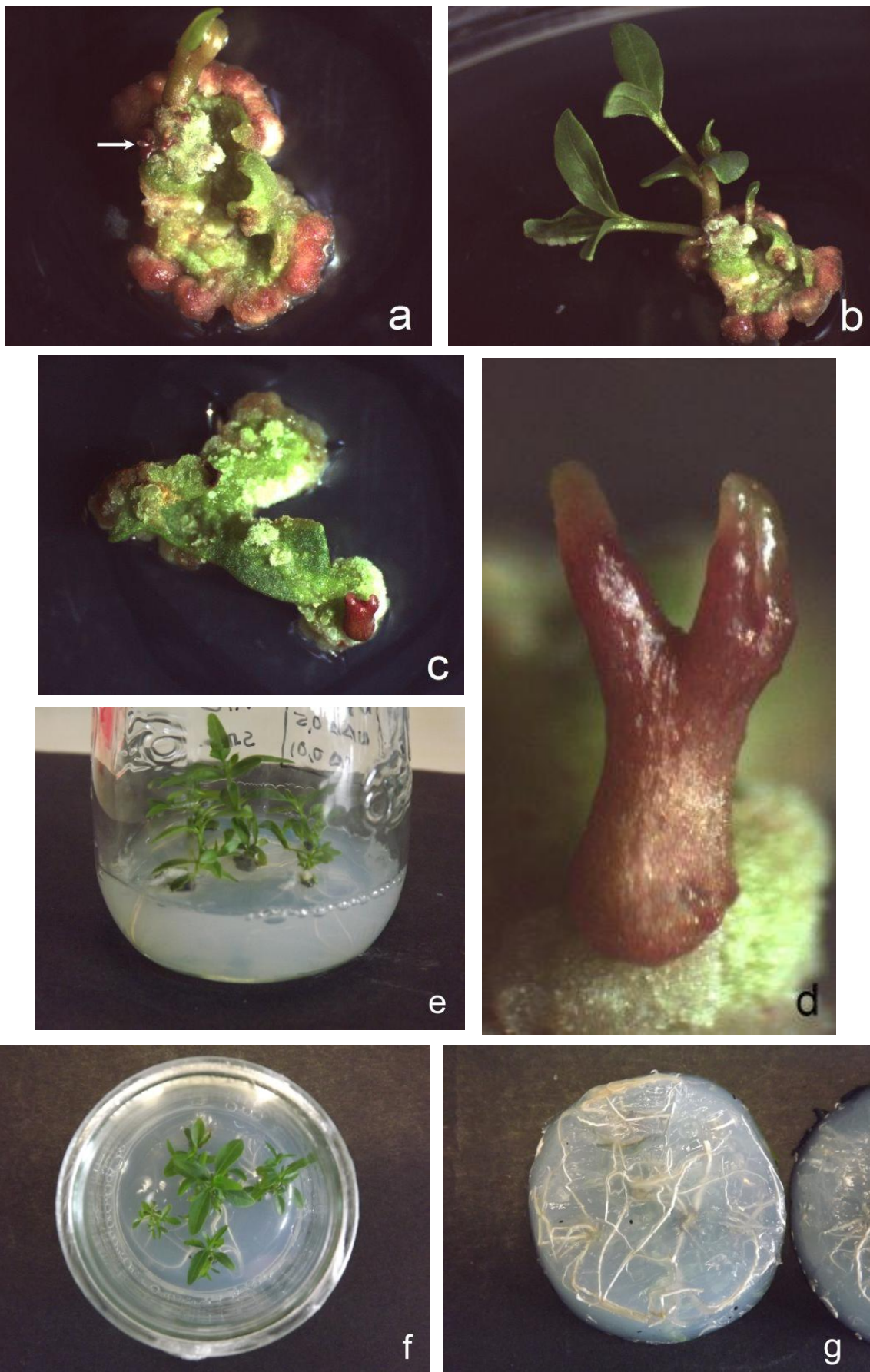


Figura 3 – Ensaio de organogênese e regeneração de plantas. **a.** Tratamento T30 (NAA 1mg/L + BA 2mg/L); observa-se um agregado de gemas (seta branca) e uma gema mais desenvolvida, 1 mês após inoculação (25x). **b.** T30, 1 mês e meio após inoculação (6,3x). **c. d.** T38 (NAA 0,5mg/L + BA 2mg/L), 1 mês (10x) e 1 mês e 2 dias (25x) após inoculação, respectivamente. **e. f.** plântulas regeneradas e enraizadas, provenientes de T38. **g.** meio de cultura evidenciando o enraizamento das plântulas.

em 60 explantes. A maioria das gemas adventícias observadas tinha origem no calo (Fig.3a, 3b e 3c).

3.3. Optimização da concentração de canamicina usada em transformação

No controlo sem adição do antibiótico, ocorreu proliferação de calos, não muito desenvolvidos, e a percentagem de organogénese de raízes é de 100% (n=30), corroborando os resultados obtidos nos ensaios de embriogénese somática nestas mesmas condições (Fig.4a). Cada explante deu origem a, pelo menos, duas raízes. No tratamento com 5mg/L de canamicina (Fig.4b) a percentagem de organogénese é de 16,7%, e o desenvolvimento destas raízes foi reduzido comparativamente ao controlo. Quando expostos à concentração de 10mg/L de canamicina (Fig.4c), os explantes apresentam uma percentagem de organogénese de apenas 3,3%, e crescimento muito fraco da raiz. Nas restantes concentrações testadas (15, 20, 25, 50 e 100mg/L), não se verificou proliferação de calos ou organogénese de raízes.

Estes resultados indicam a concentração de 10mg/L como a ideal para a selecção de raízes transgénicas.

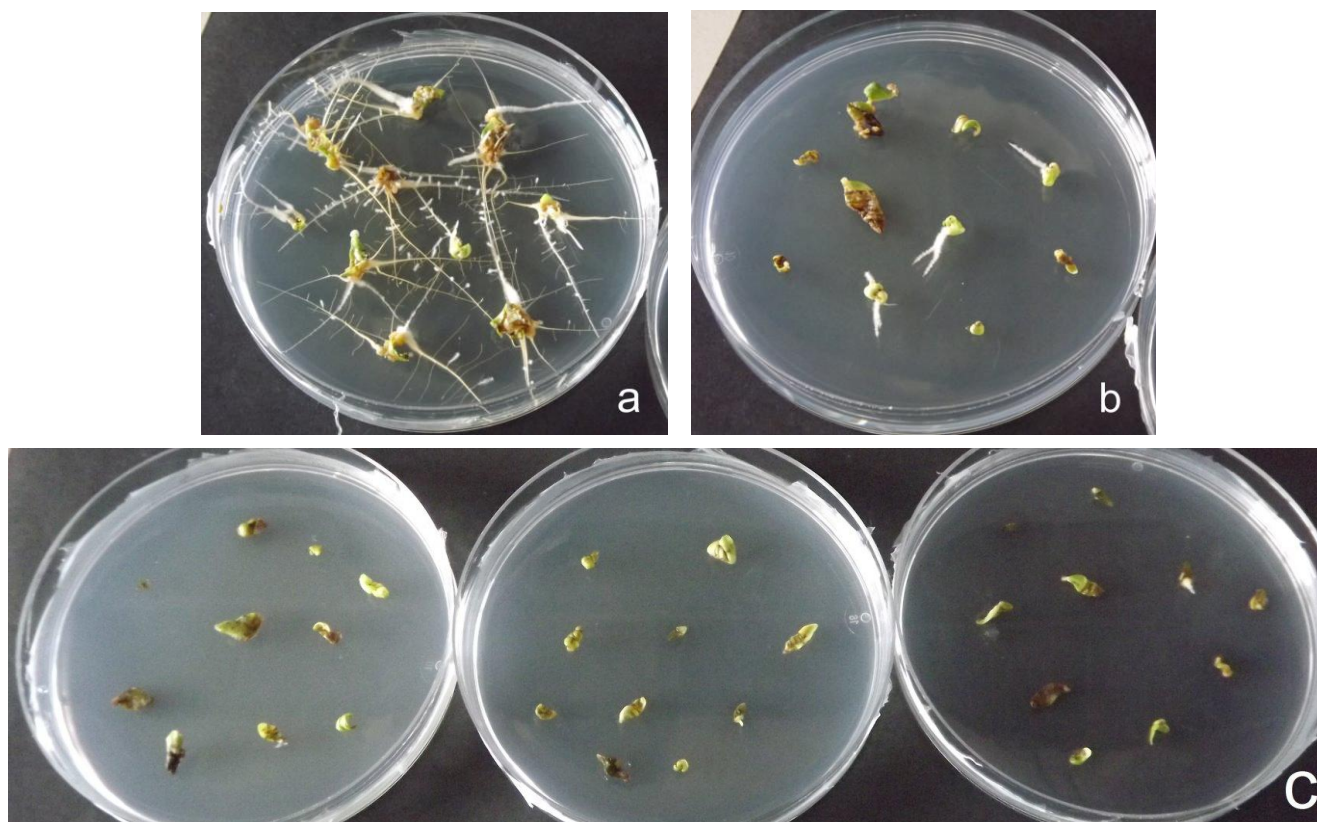


Figura 4 – Ensaio de sensibilidade à canamicina. **a.** Controlo (0mg/L de canamicina + 2mg/L NAA). **b.** Tratamento com 5mg/L de canamicina. **c.** Tratamento com 10mg/L de canamicina.

3.4. Transformação

3.4.1. Regeneração e selecção dos tecidos transgênicos

Um mês e meio após a co-cultura surgiu o desenvolvimento de raízes sob pressão selectiva. Em 130 explantes, apenas 3 explantes apresentaram desenvolvimento de raízes potencialmente transgênicas (obteve-se regeneração em apenas 3 em 130 explantes). Estima-se assim que a eficiência da transformação nas condições testadas é de 2,3%.

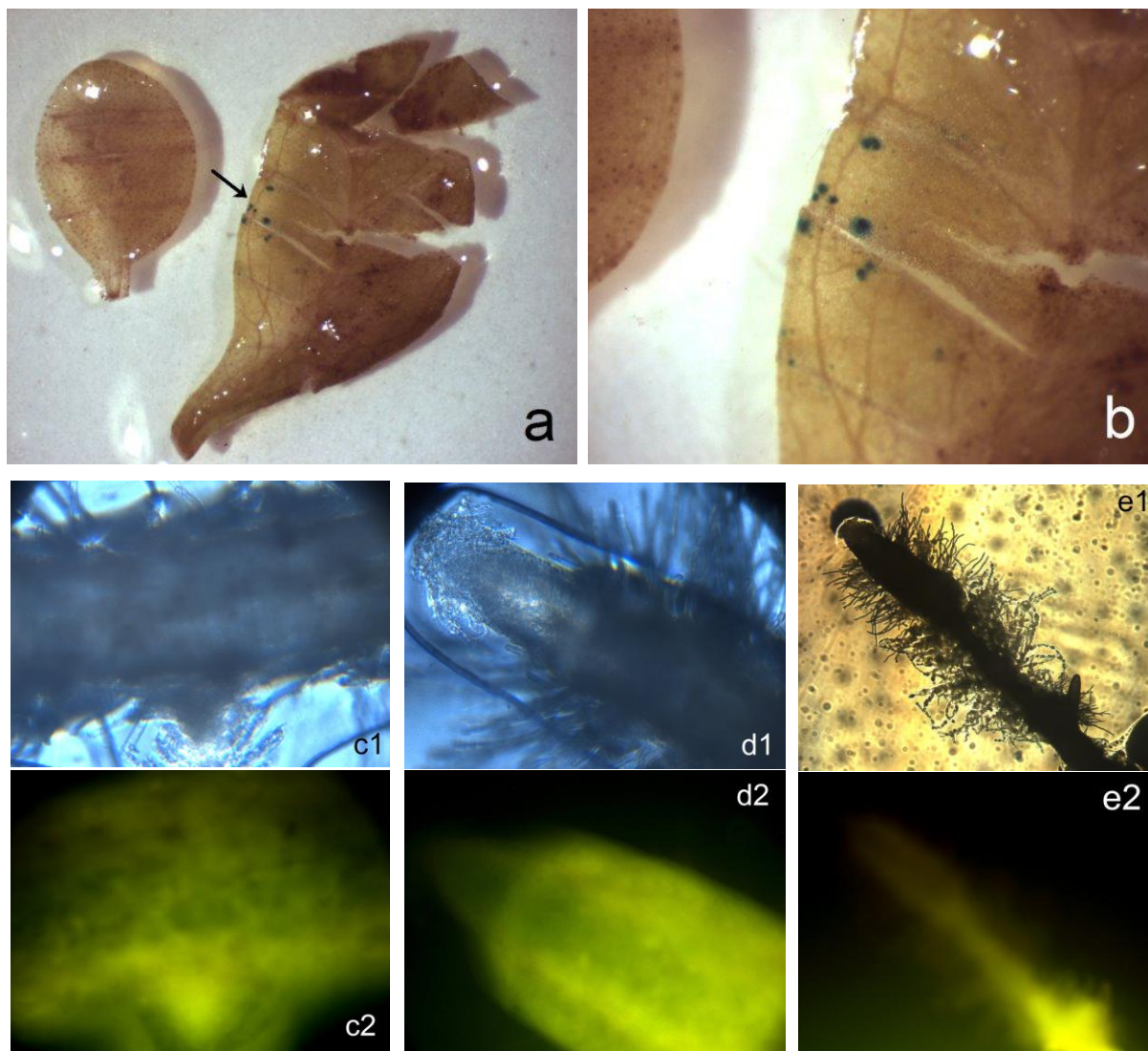


Figura 5 – Transformação de *Eucalyptus grandis*. **a.** Detecção da actividade de GUS; folha não infectada, à esquerda, e folha infectada com EHA105, à direita; cluster de células transformadas (seta preta) (12,5x). **b.** Pormenor do cluster de células transformadas (32x). **c1. d1. e1.** Microscopia com luz visível de raízes regeneradas após, aproximadamente, 2 meses após a co-cultura e inoculação (200x, 200x e 40x, respectivamente). **c2. d2. e2.** Microscopia de fluorescência das imagens correspondentes, anteriormente indicadas.

3.4.2. Análise histoquímica da actividade da β -glucuronidase

Após os 7 dias de co-cultura, detectou-se a actividade da β -glucuronidase (formação de precipitado azul nas células que a expressam) junto de uma das regiões de feridas do explante infectado com o *A. tumefaciens* contendo plasmídeo pMP2842 (Fig.5a, à direita e 5b). Também foram observados focos de expressão do gene *gus* em áreas não afectadas por ferimentos. Nos explantes não infectados não se detectou actividade da enzima (Fig.5a, à esquerda).

3.4.3. Detecção da expressão de GFP

As raízes de controlo negativo (não infectadas com *A. tumefaciens*) não apresentaram qualquer fluorescência, quando observadas em microscopia de epifluorescência (λ_{ex} = 480/40nm). Ao observar as raízes regeneradas em explantes infectados, verificou-se a emissão de fluorescência verde, demonstrando a expressão da GFP nestas raízes (Fig.5c, 5d e 5e). Este resultado confirma que as raízes regeneradas a partir de explantes infectados são transgênicas.

4. Discussão

Os principais objectivos deste trabalho são a regeneração, via embriogénese somática ou organogénese, e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Eucalyptus grandis*.

Foram estudadas mais de 30 condições diferentes para obtenção de ES, a partir de diferentes explantes, mas o objectivo não foi alcançado. Os dados recolhidos permitem averiguar a resposta dos explantes aos diferentes tratamentos, especialmente ao nível da proliferação de calos e organogénese de raízes. A regeneração por organogénese foi testada em 10 condições diferentes, com sucesso em 80% dos tratamentos (obtenção de gemas adventícias e plântulas). O isolamento das plântulas regeneradas em condições de crescimento apical e, posteriormente, em condições de enraizamento, resultou na obtenção de plantas completas de *Eucalyptus grandis*. A organogénese de raízes, verificada em alguns dos tratamentos testados, conduziu à possibilidade do estudo da transformação em *E. grandis*, com o objectivo de regenerar raízes transgénicas. Os ensaios de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de explantes foliares e posterior regeneração de raízes foram bem sucedidos, conseguindo-se uma eficiência de transformação de 2,3%.

4.1. Regeneração

4.1.1. Embriogénese somática

A regeneração por ES em *Eucalyptus* spp. depende de vários factores, como o meio de cultura e as concentrações e combinações de reguladores de crescimento testados (Pinto *et al.* 2008). Os requisitos de reguladores de crescimento para a indução de calos ou de embriogénese somática variam mesmo entre espécies no género *Eucalyptus* (Prakash e Gurumurthi, 2010), o que reflecte a necessidade de estudos em cada espécie individualmente. Outros factores que podem contribuir para a indução de ES, indução de calos (ES indirecta) e eficácia do processo são o tipo de agente gelificante, condições de luz e temperatura, tipo e idade do explante, presença de antioxidantes ou outros factores bioquímicos como a adição de aminoácidos ou extractos de outras plantas e o genótipo dos explantes (Deo *et al.* 2010).

Para a maioria das espécies, a presença de auxinas é o principal factor associado à indução e proliferação de embriões somáticos, embora também possa inibir o desenvolvimento dos mesmos (Jimenez, 2005). Em *Eucalyptus*, o uso de auxinas para induzir a embriogénese somática foi reportado em *Eucalyptus citriodora* (Muralidharan & Mascarenhas, 1987), *E. dunnii* (Termignoni *et al.*, 1996), *E. globulus* (Nugent *et al.*, 2001;

Pinto *et al.*, 2002), *E. tereticornis* (Prakash e Gurumurthi, 2005) e *E. camaldulensis* (Prakash e Gurumurthi, 2010). No presente trabalho utilizaram-se várias concentrações e combinações com NAA, 2,4-D, Zea, BA e IBA. Nenhuma das condições testadas resultou em embriogênese somática, o que pode indicar a maior recalcitrância de *Eucalyptus grandis*, comparativamente às outras espécies de *Eucalyptus*. Esta observação está em concordância com a bibliografia, uma vez que a maioria dos trabalhos descritos se baseiam na regeneração desta espécie por organogênese. O processo de regeneração por embriogênese somática em *Eucalyptus grandis* foi reportado por Watt *et al.* (1991). Foram utilizados explantes foliares, inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D, sob condições de escuridão, a 25°C, obtendo-se embriões somáticos e plantas regeneradas. Como auxina sintética, 2,4-D é um dos compostos mais eficazes para a indução de ES, já que actua como regulador de crescimento e indutor de stress (associado à indução de ES) (Fehér *et al.*, 2003). Nos ensaios efectuados no presente trabalho repetiram-se as condições descritas por Watt *et al.* (1991), mas não se verificaram os resultados esperados. Esta incongruência poderá ser explicada pelo diferente genótipo, já que o sucesso da regeneração *in vitro* em espécies lenhosas é fortemente dependente do genótipo (Gozukirmizi *et al.*, 1998), ou pela idade dos explantes (no presente trabalho utilizaram-se folhas com aproximadamente um mês). A regeneração de raízes em tratamentos com NAA foi reportada por Pinto *et al.* (2002) em *Eucalyptus globulus*. Estes resultados foram confirmados no presente trabalho, onde se verificou que a quase totalidade dos tratamentos com suplementação de NAA (individual ou em combinação) apresentaram desenvolvimento de raízes. A proliferação de raízes foi mais evidente em tratamentos suplementados apenas com NAA, enquanto a combinação de NAA com 2,4-D reduziu a frequência e desenvolvimento de raízes. Este resultado poderá indicar um efeito potencialmente inibitório de 2,4-D sobre a organogênese de raízes. Esta conclusão é confirmada por Estelle e Somerville (1987), em *Arabidopsis thaliana*, ao reportarem a influência inibitória da presença de 2,4-D no desenvolvimento e alongamento de raízes. Os tratamentos com combinação de NAA, 2,4-D e Zea não apresentam regeneração de raízes, o que pode indicar um efeito inibitório aditivo entre 2,4-D e Zea. Esta citocinina também já foi reportada como inibidora do desenvolvimento de raízes em trigo, linho e pepino (Stanlid, 1982). Relativamente à proliferação de calos, e de acordo com os resultados obtidos por Pinto *et al.* (2002), em *E. globulus*, verifica-se maior proliferação de calos em tratamentos com NAA, seguidos pelos tratamentos com 2,4-D. Os tratamentos suplementados apenas com zeatina, BA e combinação de BA e IBA (baixa concentração de auxina) revelaram proliferação de calos nula ou muito fraca, uma vez que, em *Eucalyptus* spp, é a presença de auxinas que promove a indução de calos (Pinto *et al.*, 2002).

De acordo com vários estudos com *Eucalyptus* spp, o meio MS é o mais indicado para a indução de ES (Watt *et al.*, 1991; Nugent *et al.* 2001; Pinto *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2004; Prakash e Gurumurthi, 2005; 2010). Também foi utilizado meio WPM (Lloyd e McCown, 1980), indicado para procedimentos *in vitro*, como micropropagação, em plantas lenhosas. Este meio foi utilizado por Noël *et al.* (2002) e Dai *et al.* (2003), onde reportaram a regeneração indirecta em *Populus* spp. No presente trabalho foram utilizados meio MS e WPM. Embora se verifiquem diferenças, tanto na proliferação de calos como na regeneração de raízes, não é possível comparar os resultados, uma vez que os tratamentos com meio WPM foram submetidos a condições de luz diferentes. A redução da concentração do meio (e, por conseguinte, dos nutrientes constituintes), pode levar ao aumento da frequência de ES (Nadel *et al.*, 1990; Choi e Soh, 1996). No presente trabalho foram estudados os efeitos da diminuição da força do meio na indução de ES mas não se observaram diferenças entre estas condições.

Outro parâmetro fundamental para o sucesso da regeneração *in vitro* é o tipo e idade do explante utilizado. Os explantes juvenis produzem mais embriões somáticos (Woodward e Puonti, 2001; Panaia *et al.*, 2004) e diferentes tecidos de uma mesma planta-mãe podem ter respostas diferentes (Zhang *et al.*, 2001). As concentrações de fitohormonas endógenas nos diferentes tipos de explantes podem ser uma das razões para as necessidades específicas de concentrações diferentes de reguladores de crescimento para ES (Deo *et al.*, 2010). Em *Eucalyptus* spp já foram utilizados, como explantes, embriões zigóticos (Muralidharan e Mascaranhas, 1987; Pinto *et al.*, 2002; Prakash e Gurumurthi, 2005), cotilédones, hipocótilos (Nugent *et al.*, 2001), rebentos (Termignoni *et al.*, 1996) e folhas jovens (Watt *et al.*, 1991). Em *Populus* spp, foram testados, como explantes, segmentos de caule (internodais), segmentos de raiz e folhas, para regeneração directa e indirecta de plantas (Tomovic e Kolevska-Pletikapic, 1991; Dai *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2009). Nestes três trabalhos a regeneração foi bem sucedida, apresentando-se melhores resultados em explantes caulinares, seguidos dos foliares. Os piores resultados observaram-se em explantes radiculares. Estes resultados são confirmados no presente trabalho, onde foram usados os mesmos tipos de explantes e onde se verificaram respostas. Embora não tenha ocorrido ES em nenhum dos tratamentos, verifica-se que os segmentos caulinares apresentam maior proliferação de calos e as folhas apresentam maior proliferação de raízes, observando-se o oposto nos explantes radiculares.

O efeito das diferentes condições de luz, na indução de ES, foi demonstrado, para plantas lenhosas em vários estudos (Cheong e Pooler 2004; Chung *et al.* 2005; Vila *et al.* 2007). Em *Eucalyptus globulus* (Pinto *et al.*, 2002, 2008) e *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1995) a indução de ES e obtenção de embriões somáticos foi conseguida sob condições de escuridão. No presente trabalho a fase de proliferação de calos (durante 1

mês, após inoculação) foi sempre realizada ao escuro e, após este período de tempo, os tratamentos foram colocados em fotoperíodo ou permaneceram em escuridão. Em nenhum dos casos ocorreu proliferação de embriões somáticos, mas observaram-se diferenças ao nível dos calos. Um mês após exposição a fotoperíodo, os calos apresentaram coloração acastanhada (maior oxidação), alguns pontos avermelhados (acumulação de pigmentos, o que pode evidenciar stress) ou pequenos pontos esverdeados (evidência da produção de clorofila).

A oxidação dos tecidos pode ser evitada ou reduzida por suplementação dos meios com antioxidantes, já que minimizam a morte celular resultante dos stresses aplicados aos explantes (Frame *et al.*, 2002). Em *Pinus patula*, o estudo do efeito de vários antioxidantes na indução de ES permitiu concluir que apenas o DTT não demonstrou efeitos negativos (Malabadi e Van Staden, 2005). No presente estudo foi utilizado 5mg/L de DTT em todos os ensaios, para evitar ou diminuir a potencial oxidação do material vegetal.

O tipo de agente gelificante não tem um papel directo na indução da ES, mas pode ter efeitos ao nível da vitrificação (hiperhidricidade) dos tecidos cultivados *in vitro* (Frack *et al.*, 1998). Os dois tipos de agentes mais utilizados na cultura de tecidos vegetais são o agar, extraído de uma alga do género *Laminaria*, e gelrite, um polissacarídeo extracelular produzido por *Pseudomonas elodea* (Laine *et al.*, 2000). Neste trabalho avaliaram-se os efeitos destes dois agentes gelificantes, mas não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos.

4.1.2. Organogénese

Um dos principais objectivos deste trabalho era a regeneração de plantas de *Eucalyptus grandis*, o que foi conseguido através de condições promotoras de organogénese, em explantes foliares. Tal como na ES, o sucesso da organogénese *in vitro* também depende de vários factores, como a suplementação com reguladores de crescimento e o tipo de meio de cultura. Outros factores incluem as condições de luz, o agente gelificante e o tipo e idade do explante. Neste trabalho avaliaram-se apenas os efeitos da suplementação de dois tipos de meio (MS e WPM) com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento. A regeneração por organogénese apresenta duas fases distintas. Numa primeira fase ocorre a proliferação de calos (se for indirecta), indução de organogénese, produção de gemas e desenvolvimento de plântulas. Numa segunda fase as plântulas são isoladas em meio de enraizamento, de modo a permitir a regeneração de toda a planta (Oliveira *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011, Jana e Shekhawat, 2011).

O principal regulador de crescimento para a regeneração de gemas adventícias *in vitro* é a citocinina BA (Guo *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008), embora seja também necessária a adição de uma auxina, normalmente NAA ou 2,4-D. Há vários estudos que reportam a regeneração de plantas de *Eucalyptus* spp., por organogênese, com a suplementação de meio MS com diferentes concentrações de BA e NAA (Muralidharan e Mascarenhas 1987; Serrano *et al.*, 1996; Hervé *et al.*, 2001; Dibax *et al.*, 2005; 2010; Degenhardt-Goldbach *et al.*, 2011), BA e 2,4-D (Tournier *et al.*, 2003; Alcantara *et al.*, 2010; Aggarwal *et al.*, 2010) ou BA e IAA (Hajari, 2004; Hajari *et al.*, 2006). Em *Eucalyptus grandis*, Lainé e David (1994) descrevem a organogênese obtida por inoculação de folhas em meio G22 e R5, suplementado com BA e NAA. No presente trabalho estudou-se o efeito organogenético da presença de BA e NAA, em diferentes concentrações, e TDZ com NAA, em meio MS e WPM. Os únicos tratamentos onde não ocorreu organogênese foram T35 e T36, ambos em meio WPM. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia (Muralidharan e Mascarenhas 1987; Serrano *et al.*, 1996), onde se conclui a maior eficácia do meio MS, em detrimento do meio WPM. A frequência da proliferação de gemas adventícias e plântulas pode estar associada à concentração relativa dos reguladores de crescimento, pois verifica-se que é mais elevada nas maiores concentrações de BA (Guo *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008).

O desenvolvimento dos calos é muito fraco, em todos os tratamentos, provavelmente devido às condições de luminosidade a que foram sujeitos. Seibert *et al.* (1975) demonstram o efeito da intensidade e qualidade da luz na calogênese em *Nicotiana tabacum*, concluindo que algumas condições de luz podem ter efeito inibitório. A proliferação de calos, em tabaco, pode ser melhorada quando os explantes são expostos a escuridão (Huxter e tal., 2006).

Uma vez regeneradas, as plântulas foram transferidas para meio de crescimento apical, durante um mês e meio, e finalmente transferidas para meio de enraizamento. O enraizamento em *Eucalyptus* spp. pode ser promovido pela suplementação de meio MS com baixas concentrações de auxinas, como NAA ou IBA (Sita e Rani, 1985; Azmi *et al.*, 1997; Cid *et al.*, 1999; Hajari, 2004; Hajari *et al.*, 2006). No presente trabalho foi usada uma combinação de NAA e BA, resultando no enraizamento da maioria das plântulas isoladas.

4.2. Transformação

Neste trabalho é descrita a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e regeneração de raízes transgênicas, usando explantes foliares do genótipo BRZ1 de *Eucalyptus grandis*. Para tal foi utilizada a estirpe hipervirulenta EHA 105 (Hood *et al.*, 1993), que tem sido utilizada em vários estudos que reportam transformação em *Eucalyptus* spp. (Aggarwal *et al.*, 2001; Dibax *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011 Ouyang *et al.*, 2012;. Como sugerido por Araújo *et al.* (2004) procedeu-se à co-cultura na escuridão, para evitar crescimento bacteriano excessivo.

O sucesso da regeneração de raízes depende do sistema de selecção dos tecidos transgénicos, sendo necessária a aplicação de uma concentração adequada de canamicina (raízes transgénicas apresentam resistência a este antibiótico porque o plasmídeo contém o gene *nptII*). A optimização da concentração de canamicina, apresentada neste trabalho, demonstra que a concentração 10mg/L é a mais indicada para a selecção de tecidos transgénicos. Esta concentração de canamicina tem sido variável para diferentes espécies de plantas lenhosas, incluindo em macieira (James *et al.*, 1989), choupo (Fillatti *et al.*, 1987) e noqueira (McGranahan *et al.*, 1988). Em *Eucalyptus camaldulensis*, Mullins *et al.* (1997) reportaram o uso de 9 mg/L de canamicina, enquanto, para a mesma espécie, Ho *et al.* (1998) utilizaram 40mg/L de sulfato de canamicina. Em *Eucalyptus tereticornis*, Prakash e Gurumurthi (2009) reportaram o uso de 40mg/L e Aggarwal *et al.* (2011) utilizaram 50mg/L de canamicina para a selecção de plantas transgénicas. Draper *et al.* (1988) concluem que as raízes são mais sensíveis aos antibióticos, o que justifica a baixa concentração de canamicina necessária para a selecção e regeneração de raízes transgénicas, reportada no presente trabalho.

As raízes regeneradas em meio de selecção de tecidos transgénicos apresentaram fluorescência, no comprimento de onda correspondente à GFP, quando excitadas a 480nm. As raízes utilizadas como controlo negativo não apresentaram quaisquer níveis de fluorescência basal, o que permite concluir que as raízes regeneradas eram transgénicas.

A eficiência de transformação reportada neste trabalho é de 2,3% (percentagem de explantes em que ocorreu regeneração de raízes após transformação e inoculação em meio de selecção). Este valor está em concordância com outros estudos em *Eucalyptus*: Dibax *et al.*, obtiveram uma eficiência de transformação de 0,5%, em *E. saligna* e Moralejo *et al.* (1998) apresentaram uma eficiência de transformação, em *E. globulus*, de 1,2%.

4.3. Perspectivas futuras

O insucesso da obtenção de embriogénese somática em *Eucalyptus grandis*, e o reduzido número de trabalhos, motivam a continuação do estudo deste método de regeneração nesta espécie. A embriogénese somática é o processo mais vantajoso para a regeneração de tecidos transgénicos pelo que, futuramente, se deve apostar na optimização de protocolos de indução de ES em *E. grandis*.

Há vários factores que podem ser melhorados, para atingir este objectivo. O genótipo pode ser um factor limitante para o sucesso da ES. Rutledge e Douglas (1988) estudaram 12 clones comerciais de choupo, concluindo que o genótipo do explante tinha mais influência na regeneração que a composição do meio. Neste contexto, em *Eucalyptus*

grandis, deverá proceder-se ao estudo da indução de ES em vários clones, de modo a aumentar a probabilidade de sucesso.

A pressão osmótica, por pré-tratamento dos explantes (Shi *et al.*, 2009) ou por adição de elevada concentração de sacarose no meio de indução de ES (Muralidharan e Mascarenhas, 1987) levaram ao aumento significativo da eficiência de formação de embriões somáticos. Tendo estes resultados em conta, em estudos futuros de ES em *E. grandis* deverá ser estudado o efeito da pressão osmótica, o que poderá potenciar este processo de regeneração.

Embora as concentrações e combinações de reguladores de crescimento, utilizadas neste trabalho, já tenham sido testadas anteriormente, o estudo da indução de ES sob influência de concentrações, combinações e tipos de reguladores de crescimento diferentes é também uma possibilidade. Outros factores que poderão ser estudados são as condições ambientais (temperatura, humidade e luminosidade), o pH do meio, adição de diferentes antioxidantes, tipos de explantes, suplementação com extractos de plantas ou adição de aminoácidos (Deo *et al.*, 2010).

Na regeneração por organogénese, embora os resultados tenham sido muito positivos, poderá também proceder-se à optimização do protocolo aqui apresentado, através da manipulação de vários factores, mencionados anteriormente (para ES). Neste trabalho conseguiu-se obter regeneração de plântulas, posteriormente enraizadas, mas não se procedeu à aclimatização das plantas regeneradas. A obtenção de um protocolo optimizado para esta aclimatização poderá ser alvo de estudos futuros.

O sucesso da transformação de explantes foliares com a construção p35sGusInt GFP, embora de acordo com a bibliografia para espécies de *Eucalyptus*, poderá ser optimizado. Alguns dos factores que podem ser modificados são o ferimento e tipo de explantes, tempo de co-cultura e densidade óptica da cultura bacteriana (se estes valores forem elevados potencia-se o crescimento bacteriano excessivo, que pode causar danos nos explantes), temperatura na fase de infecção ou pH do meio. Há estudos que mostram que a constituição do meio de co-cultura (concentração de sais) também é fundamental para o processo de transformação (Gao e Bao, 2004). Hu *et al.* (2010) demonstraram que a redução da força do meio basal para 50%, em conjunto com a adição de L-cisteína e DTT, promoveu um aumento na frequência da expressão transiente do gene *gus*. A manipulação destes factores poderá potenciar aumentos na eficácia da transformação.

Neste trabalho procedeu-se à transformação de explantes para obtenção de organogénese de raízes. Os resultados obtidos são positivos e poderão potenciar novos estudos envolvendo o sistema radicular desta espécie, uma vez que se prova, no presente trabalho, a possibilidade de transformação destes tecidos. Apesar de se ter conseguido

regenerar plantas por organogénese, não se procedeu a este protocolo de regeneração para explantes transformados, o que poderá ser um objectivo para estudos futuros, em *Eucalyptus grandis*.

5. Referências

- Afroz A (2010) Proteomics analysis and *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) cultivars. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Quaid-i-Azam.
- Aggarwal D, Kumar A, Reddy MS (2010) Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Tissue Organ Culture **102**: 45–52.
- Albuquerque A (2009). Gestão de eucaliptais invadidos e não invadidos por *Acacia dealbata* e os seus impactos na herpetofauna. Tese de Mestrado. Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
- Alcantara GB, Filho JCB, Quoirin M (2010) Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) **68** (2): 246-251.
- Alves HS (2005). Sequenciamento e análise do genoma cloroplastidial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Andrade G, Shah R, Johansson S, Pinto G, Egertsdotter (2011) Somatic Embryogenesis as a tool for forest tree improvement: a case-study in *Eucalyptus globulus*. BMC Proceedings 5: 128
- Araújo SS, Duque AS, Santos D, Fevereiro MPS (2004) An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **78**: 123–131.
- Azmi A, Noin M, Landré P, Proteau M, Boudet AM, Chriqui D (1997) High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **51**: 9–16.
- Bandyopadhyay S, Cane K, Rasmussen G, Hamill JD (1999). Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate *Eucalyptus* species—*Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. Plant Sci **140**(2):189–198.
- Beyl CA (2000) Getting started with tissue culture. In: Trigiano RN, Gray DJ (Ed). Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. Boca Raton: CRC Press, cap.3:21-38
- Birch RG (1997) Plant Transformation: Problems and strategies for practical applications. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:297–326.
- Brondani GE, Araújo MA, Alcântara BK, Carvalho JG, Gonçalves AN, Almeida M (2012) *In vitro* organogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of boron and calcium. Acta Scientiarum, Vol.34, nº4:403-411
- Chan, SWL (2010). Chromosome engineering: power tools for plant genetics. *Trends in biotechnology*, 28(12), 605-10. doi:10.1016/j.tibtech.2010.09.002
- Chen Z, Chang S, Ho C, Chen Y, Tsai J, Chiang V (2001). Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4-hydroxylase gene. Taiwan J For Sci **16**:249–258
- Chen Z, Tsay J, Chung J (1996). Callus culture of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium* transformation. Taiwan J For Sci **11**(1): 43–52.
- Cheng (2006). *Eucalyptus urophylla* transformation and selection. Patent: US20060101537 A1, May 11, 2006.
- Cheong EJ, Pooler MR (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February pink. Plant Cell Rep **22**: 810-815.
- Choi YE, Soh WY (1996) Effect of plumule and radicle on somatic embryogenesis in the cultures of ginseng zygotic embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult **45**: 137-143.
- Christou P (1994) The biotechnology of crop legumes. Euphytica 74:165-185
- Chung HH, Chen JT, Chang WC (2005) Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration. *In vitro* Cell Dev Biol Plant **41**: 765-769.
- Cid L, Machado A, Carnevali S, Brasileiro AC (1999) Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **56**: 17–23.
- Dai W, Cheng ZM, Sargent W (2003) Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from *in vitro* leaf tissues. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, **39**: 6-11.
- Decreto-Lei n.º 565/99, de 21 de Dezembro. D.R. n.º 295, Série I-A
- Deepika et al. (2011) Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for *Eucalyptus* clonal genotypes. BMC Proceedings 5(Suppl 7):132.
- Degenhardt-Goldbach J, Quoirin M, Buss S, Oliveira Y, Franciscon L, Gerhardt I (2011) *In vitro* shoot organogenesis from *Eucalyptus* sp. leaf explants. BMC Proceedings **5** (Suppl 7): 134.

- Deo PC, Tyagi AP, Taylor M, Harding R, Becker D (2010) Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, **28**: 27-40.
- Dibax R, Deschamps C, Bessalho Filho JC, Vieira E, Molinari C, Campos D, Quoirin M (2010). Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. *Biol Plant* **54**(1): 6-12.
- Dibax R, Deschamps C, Filho JCB, Vieira LGE, Molinari HBC, Campos MKF, Quoirin M (2010) Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. *Biologia Plantarum* **54** (1): 6-12.
- Dibax R, Eisfeld CL, Cuquel FL, Koehler H, Quoirin M (2005) Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* **62** (4): 406-412.
- Draper J, Scott R, Hamil J (1988) Plant genetic transformation and gene expression. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R. (eds) *A laboratory manual*. Blackwell Scientific, Oxford, p 103.
- Du H, Wu H, Yan J, Li J (2010) Effects of basal media, salt concentrations, antioxidant supplements and co-effects on the *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency in maize. *African Journal of Biotechnology* **9**(8): 1135-1143.
- Dudits D *et al.* (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. *In vitro Embryogenesis in Plants* p.267–308.
- Eldridge K, Davidson J, Harwood C, Wyk Gv (1993) *Eucalypt Domestication and Breeding*. Clarendon Press, Oxford, p.228-246
- Estelle MA, Somerville CR (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 200–206.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **74**: 201-228.
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 192-199.
- Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SEK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K (2002). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant physiol.* **129**: 13-22.
- Franck T, Crevecoeur M, Wuest J, Greppin H, Gaspar T (1998) Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultures on a solid medium with agar or gelrite. *Biotechnic & Histochemistry*, v.73, n.1: 32-43.
- Galvão APM e Jankowsky IP (1985) *Secagem racional da madeira*. São Paulo: Nobel: 111
- Gao LP, Bao MZ (2004) Optimization of the *uidA* gene transfer of *Rosa hybrida* via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer. *Forestry Studies China*, **6**(3): 9-14.
- Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges E, Mansur E (2011) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **106**: 47–54.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid D, Thorpe T (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue cultures. *In vitro Cell Dev Biol* **32**: 272-289
- Gepts P (2002). A comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding and Genetic Engineering. *Crop Sci.* **42**: 1780-1790.
- Girijashankar V (2012) *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **18**(1):79–87
- GIT Forestry (2008) Cultivated *Eucalyptus* global map 2008. <http://www.git-forestry.com>
- Golle DP, Reiniger LRS and Curti AR (2009). Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência Rural*, Santa Maria Vol.**39**, N.5: 1606-1613.
- Gonzalez ER, Andrade A, Bertolo L, Lacerda G, Carneiro R, Defavari V, Labate M, Labate C (2002) Production of transgenic *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. *Funct Plant Biol* **29**(1): 97–102.
- Gozukirmizi N, Bajrovic K, Ipekci Z, Boydak M, Akalp T, Tunctaner K, Balkan H, Tanrıyar H, Calikoglu M, Ogras T, Ozden O, Tulukcu M, Tank T (1998). Genotype differences in direct plant regeneration from stem explants of *Populus tremula* in Turkey. *J. For. Res.* **3**: 123-126.
- Grattapaglia D (2008). Melhoramento de *Eucalyptus*: híbridos, clonagem e marcadores moleculares. Palestra. Capturado a 20 de Junho. Disponível online em http://www.cenargen.embrapa.br/palestras/21102006/21102006_001.pdf
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa, SPI Vol.1:184-250

- Guidolin AF. Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium* (2003). Tese de Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Guo DP, Zhu ZJ, Hu XX, Zheng SJ (2005) Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **83**: 123-127.
- Hajari E (2004) Establishment of an indirect organogenesis protocol for *Eucalyptus grandis* species and hybrids. Dissertação de Mestrado, School of Biological and Conservation Sciences, Universidade de KwaZulu-Natal.
- Hajari E, Watt MP, Mycock DJ, McAlister B (2006) Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. *South African Journal of Botany* **72**: 195 – 201.
- Harcourt RL, Kyoizuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000). Insect- and herbicide-resistant transgenic *Eucalyptus*. *Mol Breed* **6**: 307–315.
- Hervé P, Jauneau A, Pâques M, Marien JN, Boudet AM, Teulières C (2001) A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Science* **161**: 645–653.
- Ho CK, Chang SH, Tsay JY, Tsai CJ, Chiang VL, Chen ZZ (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep* **17**:675–680.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS & Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Science* **227**: 1229–1231
- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM (2006) Shoot initiation in light- and dark-grown tobacco callus: the role of ethylene. *Physiologia Plantarum* **53** (3): 319–326.
- Ishige N, Kondo K, Furuyjo A, Hibino T (2004). Genetic improvement for environmental stress resistance in *Eucalyptus*. In: Proc Plant and Animal Genome 12th Conf, San Diego, California, 10–14.
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep.* **7**: 658-661.
- Jana S, Shekhawat (2011) Plant growth regulators, adenine sulfate and carbohydrates regulate organogenesis and *in vitro* flowering of *Anethum graveolens*. *Acta Physiol Plant* **33**: 305–311.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901-3907
- Jenes B, Moore H, Cao J, Zhang W, Wu R (1993) Techniques for gene transfer. In: Kung S, Wu R (ed.) *Transgenic plants*. New York: Academic Press; cap. 4:125–146.
- Jimenez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* **47**: 91-110.
- Kawaoka A, Nanto K, Ishii K, Ebinuma H (2006). Reduction of lignin content by suppression of expression of the LIM domain transcription factor in *Eucalyptus camaldulensis*. *Silvae Genet* **55**(6): 269–277.
- Kawaoka A, Nanto K, Sugita K, Endo S, Yamada-Watanabe K, Matsunaga E, Ebinuma H (2003). Production and analysis lignin modified transgenic *Eucalyptus*. In: Sundberg B (ed) *IUFRO tree biotechnology*. Umea Plant Science Center, Umea, pp S10–S16.
- Kawasui T, Susuki Y, Wada T, Kondo K, Koyama H (2003). Over expression of a plant mitochondrial citrate synthase in *Eucalyptus* trees improved growth when cultured by alphosphate as a sole phosphate source. *Plant Cell Physiol* **44**: S91.
- Kerbaui GB (1999) Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Tôrres AC, Caldas LS, Buso JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vol.2, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq p.519-531
- Konan EE *et al.* (2005). A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **84**, 100-113.
- Kondo K, Furuyjo A, Ishige N, Kasuga M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Hibino T (2003). Analysis of the stress response genes in *Eucalyptus* and effect of introducing several stress tolerance-giving genes into *Eucalyptus*; A development situation and a practical possibility of an environmental stress resistant tree. In: Proc Plant and Animal Genome 11th conf San Diego California, <http://www.intl-pag.org/11/p7b-p826-xi.html>.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyoizuka J (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**: 652-655.
- Lainé E, David A (1994) Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Reports* **13**: 473-476.

- Laine E, Lamblin F, Lacoux J, Dupre P, Roger D, Sihachakr D, David A (2000) Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **63**: 77-80.
- Lakshmanan P (2006). Invited review addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane - an addendum to the invited review "Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities", *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* V.41 N.4: 201-205.
- Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, Grof CLP, Bonnett GD, Smith GR (2005). Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* V.41: 345-363.
- Le Roux JJ, Van Staden J (1991) Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review. *Tree Physiol* **9**: 435–477
- Lelmen, KE Yu X, Kikuchi A, Shimazaki T, Mimura M and Watanabe KN (2010). Mycorrhizal colonization of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the mangrin gene for salt tolerance. *Plant Biotechnology*, Vol. **27**: 339-344.
- Linacero R, López-Bilbao MG, Vásquez AM (2001). Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis (*Saccharum officinarum*). *Protoplasma* V.1: 199-204.
- Liu G, Liu Y, Yang J, Hu K (2010) Establishment of genetic transformation of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. *Journal of Northwest Forestry*.
- Lloyd G, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc.* **30**: 421-427.
- Macedo AF (2010). Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. Tese de Mestrado, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT.
- Machado R, Andrade D, Cid B, Penchel RM, Brasileiro M (1997). *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). *PI Cell Rep* **16**:299–303.
- Macrae S, Van Staden J (1993). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of *Eucalyptus*. *Tree Physiol* **12**: 411–418.
- Malabadi RB, Van Staden J (2005) Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **41**: 181-186.
- Manders G, Santos D, Utra Vaz FB, Davey MR, Power JB (1992). Transient gene expression in electroporated protoplasts of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **30**: 69–75.
- McGranahan GH, Leslie CA, Uratsu SL, Martin LA, Dandekar AM (1988) *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technol.* **6**: 800-804.
- Meskimen G e Francis JK. Rose Gum *Eucalyptus*. Silvics of North America. Revisão a 28 de Julho de 2012. Consulta a 18 de Setembro de 2012. http://www.na.fs.fed.us/pubs/silvics_manual/volume_2/Eucalyptus/grandis.htm
- Monsanto (2012) Plant Biotechnology Basics. <http://www.monsanto.co.uk/primer/basics.html>
- Moralejo M, Rochange F, Boudet AM, Teulieres C (1998). Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Aust J Plant Physiol* **25**(2): 207–212.
- Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordón Y, Guardiola JL, García-Luis A (2000) Direct and indirect shoot organogenesis pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. *Annals of Botany*, London, Vol.85:103-110
- Moreira-Dias JM, Molina RV, Guardiola JL, García-Luis A (2001) Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam Vol.87:275-290.
- Mullins KV, Llewellyn DJ, Hartney VJ, Strauss S and Dennis ES (1997). Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports* Vol. **16**, N.11: 787-791.
- Muralidharan EM, Mascarenhas AF (1987) *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. *Plant Cell Rep* **6**: 256-259.
- Muralidharan EM, Mascarenhas AF (1995) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. Em: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants, vol. 2— angiosperms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 23–40.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Myburg *et al.* (2011) The *Eucalyptus grandis* Genome Project: Genome and transcriptome resources for comparative analysis of woody plant biology. *BMC Proceedings*, **5**(Suppl 7):I20

- Nadel BL, Altman A, Ziv M (1990) Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension. 2. Early detection of embryogenic potential and induction of synchronized cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **20**: 119-124.
- Noël N, Leple JC, Pilate G (2002). Optimization of *in vitro* micropropagation and regeneration for *Populus X interamericana* and *Populus X euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa* and *P. nigra*). *Plant Cell Rep.* **20**: 1150-1155.
- Nugent G, Chhandler SF, Whitemn P, Stevenson T (2001) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell, Tiss Organ Clut* **67**: 85-88
- Oliveira M, Costa M, Silva C, Otoni W (2010) Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.* **45** (7).
- Oller J, Toribio M, Celestino C, Toval G (2004) The culture of elite adult trees in a genetic improvement programme through *Eucalyptus globulus* labill. Clonal micropropagation. In “ *Eucalyptus* in a changing world” (Eds. NMG Borralho, JS Pereira, C Marques, J Coutinho, M Madeira and M Tomé) pg 539- 540. *Proc. IUFRO Conf. Aveiro*, 11- 15 Outubro.
- Ouyang L, Huang Z, Zhao L, Sha Y, Zeng F, Lu X (2012) Efficient Regeneration of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* from Stem Segment. *Braz. Arch. Biol. Technol.* Vol.55, nº3:329-334
- Ouyang LJ, He WH, Huang ZC, Zhao LY, Peng SH, Sha YE, Zeng FH, Lu XY (2012) Introduction of the Rs-AFP2 gene into *Eucalyptus urophylla* for resistance to *Phytophthora capsici*. *Journal of Tropical Forest Science* **24** (2): 198-208.
- Panaia M, Senaratna T, Dixon KW, Sivasithamparan K (2004) The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. *Australian Journal of Botany* **52**: 257-265.
- PEFC Portugal, (2010) “Particularidades da Floresta Portuguesa”, <http://www.pefc.pt/particularidades-da-floresta/floresta-portuguesa>. Acesso dia 24 de Outubro de 2011.
- Pinto G (2007). Regeneração de plantas de *Eucalyptus globulus* por embriogénese somática. Tese de Doutoramento, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.
- Pinto G, Santos C, Neves L, Araújo C (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Rep* **21**(3):208-213
- Pinto G, Silva S, Coutinho J, Araujo C, Neves L, Santos C. (2006) Importance of media mineral composition on the induction of somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. 2º Simpósio Iberoamericano de *Eucalyptus globulus*. 17- 20 de Outubro, Pontevedra, Espanha.
- Pinto G, Silva S, Park Y, Neves L, Araújo C, Santos C (2008). Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* **95**: 79-88
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM, Reis JB (2005) Genomic research in *Eucalyptus*. *Genética* **125**:79-101
- Potrykus I (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 205–225.
- Prakash MG, Gurumurthi K (2005) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. *Cur Sci* **88** (8): 1311- 1316
- Prakash MG, Gurumurthi K (2009) Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Using *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro Cell Dev Biol Plant* **45** (4):429–434
- Prakash MG, Gurumurthi K (2010) Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **100**: 13–20.
- Queiroz DL, Zanol KMR, Oliveira EB, Anjos N and Majer J (2010). Feeding and oviposition preferences of *Ctenarytaina spatulata* Taylor (Hemiptera, Psyllidae) for *Eucalyptus* spp. and other Myrtaceae in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* Vol.**54** N.1: 149-153.
- Quisen RC (2007). Transformação genética De *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. PhD Thesis Agronomical Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil.
- Richard D, Lescot M, Inzé D, DeVeylder L (2002). Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* V.69: 167-176.
- Rochange F, Serrano L, Marque C, Teulieres C, Boudet AM (1995). DNA delivery into *Eucalyptus globulus* zygotic embryos through biolistics: optimization of the biological and physical parameters of bombardment for two different particle guns. *Plant Cell Rep* **14**: 674–678
- Rodríguez S, Mondéjar C, Ramos ME, Díaz E, Maribona R, Ancheta O (1995). Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. *Tissue & Cell* V.**28** N.2: 149-154.

- Rozefelds AC (1996). *Eucalyptus* phylogeny and history: a brief summary. Tasforests Vol.8
- Sartoretto LM, Barrueto CLP, Brasileiro ACM (2002). Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* callus. *Funct Plant Biol* **29**:917–924.
- Sartoretto LM, Saldanha CW and Corder MPM (2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, Santa Maria, Vol.38 N.3: 861-871.
- Seibert M, Wetherbee PJ, Job DD (1975) The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiology* **56** (1): 130-139.
- Serrano L, Rochange F, Semblat JP, Marque C, Teulieres C, Boudet AM (1996). Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. *J Exp Bot* **47**: 285–290.
- Serrano L, Rochange F, Semblat JP, Marque C, Teulieres C, Boudet AM (1996) Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. *Journal of Experimental Botany* **47** (2): 285-290.
- Shani Z, Dekel M, Cohen B, Barimboim N, Kolosovski N, Safranuvitch A, Cohen O, Shoseyov O (2003). Cell wall modification for the enhancement of commercial *Eucalyptus* species. In: Sundberg B (ed) IUFRO tree biotechnology. Umea Plant Science Center, Umea, pp S10–S26.
- Shao Z, Chen W, Luo H, Ye X, Zhan J (2002). Studies on the introduction of cecropin D gene into *Eucalyptus urophylla* to breed the resistant varieties to *Pseudomonas solaniacearum*. *Sci Silvae Sin* **38**: 92–97.
- Shi X, Dai X, Liu G, Bao M (2009) Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees* **23**:1033–1042.
- Silva ALL, Oliveira Y, Costa JL, Mudry CS, Procopiuk M, Scheidt GN, Brondani GE (2011) Preliminary results for genetic transformation of shoot tip of *Eucalyptus saligna* Sm. via *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* Vol.2, N.1.
- Silva RP, Costa MAPC, Souza AS, Almeida WAB (2005) Regeneração de plantas de laranja "Pêra" via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, Vol.40, Nº12:1153-1159
- Sita GL, Rani BS (1985) *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. *Plant Cell Reports* **4**: 63-65.
- Spokevicius AV, Southerton SG, Mac Millan CP, Qiu D, Gan S, Tibbits JFG, Moran GF, Bossinger G (2007). β -tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. *Plant J* **51**: 717–726.
- Spokevicius AV, Van Beveren K, Leitch MA, Bossinger G (2005). *Agrobacterium*-mediated *in vitro* transformation of woodproducing stem segments in eucalypts. *Plant Cell Rep* **23**: 617–624.
- Steiner N, Santa-Catarina C, Andrade JBR, Balbuena TS, Guerra MP, Handro W, Floh EIS, Silveira V (2008). *Araucaria angustifolia* Biotechnology - Review. *Functional Plant Science and Biotechnology* V.2: 20-28
- Stenlid G (1982) Cytokinins as inhibitors of root growth. *Physiologia Plantarum* **56**: 500–506
- Stewart CN, Jr. (2008) *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications*. John Wiley & Sons, Inc.
- Studart-Guimarães C *et al.* (2003). Transformação genética em espécies florestais. *Ciência Florestal* Vol.13, N.1: 167-178.
- Sugiyama M (1999). Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol* **2**:61–64.
- Suzuki Y, Kawazu T, Tsuyama M, Wada T, Kondo K, Mizuno R, Hara T, Koyama H (2004). Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase. *Nippon Shokubutsu Seiri Gakkai Nenkai oyobi Shinpojiumu Koen Yoshishu* **45**:07.
- Tang W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ (2004). The effect of different plant growth regulators on adventitious shoot formation from (*Pinus virginiana*) zygotic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* V.78: 237-240.
- Taylor LR, Spokevicius AV, Mac Millan CP, Southerton SG, Bossinger G (2007). Promoter studies during tension wood formation using induced somatic sector analysis (ISSA). Poster presented at IUFRO Tree Biotechnology Congress.
- Termignoni RR, Wang PJ, HU CY (1996) Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **45**:129- 132
- Teulieres C, Grima Pettenati J, Curie C, Teissie J, Boudet AM (1991). Transient foreign gene expression in polyethylene/glycol treated or electropulsated *Eucalyptus gunnii* protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **25**: 125–132.
- Thorpe TA (1990) The current status of plant tissue culture. In: Bhojwani SS (ed) *Plant Tissue Culture: applications and limitations*. Elsevier Amsterdam Oxford New York Tokyo, pp 1-33.

- Thorpe TA (1994) Morphogenesis and regeneration. In: Vasil IK, Thorpe TA (Ed) Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic, cap.2: 17-36
- Tomović Z, Kolevska-Pletikapić B (1991) Plant regeneration from callus tissue cultures of poplars. *Genetika*, **23**(3): 215-222.
- Tournier V, Grat S, Marque C, El Kayal W, Penchel R, Andrade DG, Boudet AM, Teulieres C (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Trans Res* **12**: 403–411.
- Tournier V, Grat S, Marque C, Kayal W, Penchel R, Andrade G, Boudet AM, Teulieres (2003) An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis*x*Eucalyptus urophylla*). *Transgenic Research* **12**: 403–411.
- Trindade H (1996) *Eucalyptus globulus* Labill: systems for *in vitro* regeneration. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Uranbey S, Sevimay CS, Kaya MD, Ipek A, Sancak C, Basxalma D, Er C, Ozcan S (2005) Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Biologia Plantarum* **49**: 53–57.
- Valerio L, Carter D, Rodrigues JC, Tourier V, Gominho J, Marque C, Boudet AM, Maunders M, Pereira H, Teulieres C (2003). Down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. *Mol Breed* **12**: 157–167.
- Van Beveren K, Spokevicius AV, Tibbits J, Wang Q, Bossinger G (2006). Transformation of cambial tissue in vivo provides efficient means for Induced Somatic Sector Analysis (ISSA) and gene testing in stems of woody plants species. *Funct Plant Biol* **33**: 629–638.
- Vila SK, Rey HY, Mroginski LA (2007) Factors affecting somatic embryogenesis induction and conversion in “Paradise tree” (*Melia azedarach* L.). *J Plant Growth Regul* **26**: 268-277.
- Wadl PA (2005) Improved regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.). Tese de Mestrado, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Watt MP, Berjak P, Aneliswa M, Blakway F (2003) *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **75**: 233-140
- Watt MP, Blakway F, Cresswell CF, Herman B (1991) somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *South African Forestry Journal* **157**:59- 65
- Watt MP, Duncan M, Blakeway FC, Herman B (1995). Field performance of micropropagated *Eucalyptus* hybrids. *South African Forestry Journal*, N.173: 17- 21
- Woodward B, Puonti KJ (2001) Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* **120**: 1-6.
- Xavier A, Comério J, Ianelli, CM (1997). Eficiência da estaquia, da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *Eucalyptus*, Salvador. Proceedings ... Colombo: EMBRAPA V.2: 40-45.
- Xu Z, Um YC, Kim CH, Lu G, Guo DP, Liu HL, Bah AA, Mao A (2008) Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. *Acta Physiol. Plant.* **40**: 521-528.
- Yadav R, Arora P, Kumar D, Katyal D, Dilbaghi N, Chaudhury A (2009) High frequency direct plant regeneration from leaf, internode, and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides*). *Plant Biotechnol. Rep.* **3**: 175-182.
- Yamada-Watanabe K, Kawaoka A, Matsunaga K, Nanto K, Sugita K, Endo S, Ebinuma H, Murata N (2003) Molecular breeding of *Eucalyptus*: analysis of salt stress tolerance in transgenic *Eucalyptus camaldulensis* that over-expressed choline oxidase gene (codA). In: Sundberg B (ed) IUFRO tree biotechnology. Umea Plant Science Centre, Umea, pp S7–S9
- Yao JL (2005) *Eucalyptus* transformation method. Patent: US 2005/ 0086714 A1. April, 21, 2005
- Zhang BH, Feng R, Liu F, Wang Q (2001) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **42**: 9-16.